



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ PLAZMOVÉ TRYSKY PRO HOJENÍ RAN

USE OF PLASMA JET FOR WOUND HEALING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Dvořáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1494/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Eva Dvořáková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití plazmové trysky pro hojení ran

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Aplikace nízkoteplotního plazmatu na humánní kožní buňky
- 3) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Eva Dvořáková
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce byla zaměřena na možnosti využití plazmové trysky pro urychlení procesu hojení ran. Z mnoha studií jsou známy výhody využití nízkoteplotního plazmatu v medicíně či biomedicínských aplikacích a již dnes je nízkoteplotní plazma využíváno ke sterilizaci zdravotnických prostředků, materiálů či chirurgických nástrojů. Některé studie uvádějí také vysoký potenciál využití plazmové trysky při léčbě kožních ran.

V experimentální části této práce byl nejprve s využitím dvou různých zdrojů nízkoteplotního plazmatu proveden *in vitro* test hojení ran. Zdrojem č. 1 byl mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou a jako zdroj č. 2 byl použit pochodňový mikrovlnný výboj. *In vitro* test hojení ran (scratch test) byl proveden na monovrstvě keratinocytů linie HaCaT a testování bylo uskutečněno za použití různých parametrů. Sledován byl především vliv doby ošetření plazmatem, dále také vliv použitého výkonu plazmového výboje a rovněž vliv průtoku pracovního plynu argonu. Především při použití pochodňového mikrovlnného výboje bylo oproti kontrole zaznamenáno rychlejší hojení rány při většině použitých nastavení. Lze tedy říci, že tento zdroj se jeví jako potenciálně vhodný pro rychlejší hojení ran.

Dále byla v práci s využitím MTT testu cytotoxicity sledována také viabilita kožních buněk po jejich oplazmování při použití stejných podmínek jako u *in vitro* testu hojení ran. Při provedení standardního MTT testu nevykazovaly žádné z použitých nastavení ani zdrojů vůči keratinocytům žádné cytotoxické účinky. Pro ověření správnosti MTT testů byly souběžně provedeny také LDH testy cytotoxicity. Výsledky obou testování se shodovaly a využití nízkoteplotního plazmatu při ošetření pokožky lze tak považovat za bezpečné.

Celkově lze z dosažených výsledků konstatovat, že plazmová tryska může nalézt využití v medicíně při hojení kožních ran a chronických defektů jako potenciálně rychlá, levná a účinná metoda.

Klíčová slova

Plazmová tryska, pochodňový mikrovlnný výboj, mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, hojení ran, keratinocyty, nízkoteplotní plazma

ABSTRACT

This diploma thesis was focused on the possibility of using a plasma nozzle to accelerate the wound healing process. The benefits of using low-temperature plasma in medicine or biomedical applications are known from many studies, and low-temperature plasma is already used to sterilize medical devices, materials or surgical instruments. Some studies also report a high potential of using plasma nozzle in the treatment of skin wounds.

In the experimental part of this work, an *in vitro* wound healing test was performed using two different low-temperature plasma sources. Source No. 1 was a surface wave microwave discharge and source No. 2 was a torch microwave discharge. An *in vitro* scratch healing test was performed on a monolayer of HaCaT keratinocytes and testing was performed using various parameters. The influence of the plasma treatment time was monitored, as well as the influence of the plasma discharge power and also the influence of the argon working gas flow. Especially when using a torch microwave discharge, faster wound healing was recorded at most of the parameters used compared to the control. Thus, it can be said that this source appears to be potentially suitable for faster wound healing.

Furthermore, in the work using the MTT cytotoxicity test, the viability of skin cells after their plasmination was also monitored using the same conditions as in the *in vitro* wound healing test. When performed in the standard MTT assay, none of the settings or sources used showed any cytotoxic effects on keratinocytes. LDH cytotoxicity tests were also performed concurrently to verify the accuracy of the MTT assays. The results of both tests agreed and the use of low-temperature plasma in skin treatment can be considered as safe.

Overall, the results show that the plasma nozzle can find use in medicine in the healing of skin wounds and chronic defects as a potentially fast, inexpensive and effective method.

Keywords

Plasma nozzle, torch microwave discharge, surface wave microwave discharge, wound healing, keratinocytes, low temperature plasma

DVOŘÁKOVÁ, Eva. *Využití plazmové trysky pro hojení ran*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131445>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych chtěla poděkovat především vedoucí mé diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odbornou pomoc, rady, konzultace a její dobrou náladu. Dále bych chtěla poděkovat i doktorandkám, které mi pomohly či poradily, když jsem potřebovala, proto děkuji především Ing. Julii Hoové a Ing. Kateřině Smejkalové. Moje poděkování dále patří mému příteli za trpělivost, a hlavně mým rodičům, kteří mi umožnili studovat a podporovali mě ve všech směrech. Tato diplomová práce byla také podpořena projektem *Posilnenie výskumno-vývojovej kapacity Slovensko-českého cezhraničného regiónu v oblasti plazmových technológií pre medicínske použitie* v rámci programu EU INTEREG VA SK-CZ, číslo 304011P709.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Kůže	9
2.2	Kožní bariéra.....	9
2.3	Struktura kůže	11
2.3.1	Epidermis.....	11
2.3.2	Dermis a podkožní tkáň.....	12
2.4	Proces hojení kožních ran	12
2.4.1	Hemostáza	13
2.4.2	Zánětlivá fáze	14
2.4.3	Proliferační fáze.....	15
2.4.4	Fáze zrání (remodelace).....	16
2.5	Role keratinocytů v procesu hojení ran.....	16
2.6	Plazma.....	16
2.6.1	Nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku.....	17
2.6.2	Účinky nízkoteplotního plazmatu na hojení ran.....	18
2.6.3	Výhody použití nízkoteplotního plazmatu	19
2.7	Buněčná linie HaCaT	20
2.8	Testování cytotoxicity <i>in vitro</i>	20
2.8.1	MTT test	20
2.8.2	LDH test	21
2.9	Testování průběhu hojení rány pomocí scratch testu.....	21
3	CÍLE PRÁCE	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1	Použité přístroje	24
4.2	Použité chemikálie	24
4.3	Použité buňky.....	24
4.4	Práce s kožními buňkami	24
4.4.1	Příprava média pro kultivaci buněk HaCaT	24
4.4.2	Kultivace buněk.....	24
4.4.3	Pasážování buněk	25
4.5	Plazma a aparatura	26

4.5.1	Mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou (zdroj č. 1).....	26
4.5.2	Pochodňový mikrovlnný výboj (zdroj č. 2).....	26
4.6	Scratch test č. 1 a oplazmování.....	27
4.7	Scratch test č. 2 a oplazmování.....	28
4.8	MTT test a oplazmování	31
4.9	LDH test.....	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	Výsledky scratch testu č. 1.....	36
5.2	Výsledky scratch testu č. 2.....	40
5.3	Výsledky MTT testu	44
5.3.1	MTT test (oplazmování bez média zdroj č. 2).....	47
5.3.2	MTT test (oplazmování bez média zdroj č. 1).....	47
5.3.3	MTT test (oplazmování s médiem zdroj č. 1, průtok prac. plynu 3 l/min).....	48
5.3.4	MTT test (oplazmování s médiem zdroj č. 2, průtok prac. plynu 3 l/min).....	49
5.3.5	MTT test (oplazmování s médiem, vyšší průtoky pracovního plynu).....	50
5.4	Vyhodnocení LDH testu	51
6	ZÁVĚR.....	55
7	SEZNAM ZKRATEK.....	57
8	ZDROJE.....	58
9	PŘÍLOHY.....	63
9.1	Detailní snímky průběhu scratch testu č. 1	63
9.2	Detailní snímky průběhu scratch testu č. 2	73

1 ÚVOD

Kůže je našim největším orgánem a je v první linii v boji proti infekci či zranění. Poskytuje ochranu proti vnějším vlivům, patogenům, ztrátě vody ale také nás chrání před různými typy záření jako je ultrafialové, tepelné či chemické záření. Prostřednictvím kůže reguluje náš organismus také tělesnou teplotu a zprostředkovává komunikaci prostřednictvím řady nervových zakončení, cytokinů či hormonů. Naše kůže má obrovský regenerační potenciál. Skládá se ze tří vrstev. První nejsvrchnější vrstvou je epidermis, složená z keratinocytů, které syntetizují keratin, dlouhý vláknitý protein s ochrannou funkcí. Střední vrstva, dermis, je tvořená fibrilárním proteinem kolagenem. Dermis leží na podkožní tkáni, která obsahuje především tukové buňky, známé jako lipocyty. Pokud se kůže poruší ať už chemickým či fyzikálním způsobem, nastává komplikovaný mechanismus hojení rány.

Obecně lze proces hojení rozdělit do čtyř prolínajících se fází: hemostáza, zánětlivá fáze, proliferace a fáze remodelace/zrání. Při hemostáze nastávají vazokonstrikce, které zamezí krvácení a omezí přístup kyslíku a živin do okolní tkáně. Nedostatek kyslíku a změny pH, podporují aktivaci, adhezi a agregaci krevních destiček. Po hemostáze nastává zánětlivá fáze, která je zahájena uvolněním růstových faktorů a bioaktivních molekul, které aktivují akutní zánět. Zánět připravuje ránu pro další fáze hojení, čistí tělo od cizích látek, likviduje odumřelou tkáň a zúčastněné buňky uvolňují mediátory k rozvoji procesů, které budou následovat. Další fází je fáze proliferace. Jejím úkolem je pokrytí povrchu rány, tvorba granulační tkáně a obnovení vaskulární sítě. Poslední fází je fáze remodelace či zrání, která se vyznačuje kontrakcí rány a remodelací kolagenem. Keratinocyty hrají v hojení rány velkou roli. Nejen pro zachování kožní bariéry, ale také pro její obnovu při procesu reepitelizace. V první vrstvě, která pokrývá ránu, začínají keratinocyty proliferovat, pro zajištění dostatečného přísunu buněk k uzavření rány. Schopnost proliferovat mají pouze bazální keratinocyty. Mnohdy je hojení rány obtížné, a proto se vědci a lékaři zaměřují na vývoj nových prostředků a řešení, jak zacelení rány urychlit. Jako jedna z možností se nabízí použití plazmatu.

Plazma je tzv. kvazi-neutrální ionizovaný nebo částečně ionizovaný plyn v elektrickém výboji. Jedná se o reaktivní prostředí, které nachází uplatnění v mnoha odvětvích a aplikacích. V závislosti na teplotě částic lze rozdělit plazma na termální a netermální. Termální je téměř dokonale ionizovaný plyn s teplotou částic okolo 15 000 K. Zatímco netermální/studené/nízkoteplotní plazma je částečně ionizovaný plyn s teplotou do 340 K. V současné době je nízkoteplotní plazma využíváno při studiu hojení ran či sterilizaci chirurgických nástrojů a lékařských materiálů. Bylo také zjištěno, že by se nízkoteplotní plazma dalo využít k přímé aplikaci na kůži. Má schopnost indukovat biologické procesy generováním reaktivních kyslíkových a dusíkových částic, které jsou vhodné pro různé biologické aplikace. Tento druh plazmatu také emituje UV záření, které je zodpovědné za mnoho biologických účinků. Dle studií není léčba hojení ran nízkoteplotním plazmatem v nízkých dávkách nebezpečná, a naopak indukuje proliferaci buněk, zatímco delší expozice plazmatem vede k buněčné smrti. Několik studií na zvířatech prokázalo stimulaci zánětlivých odpovědí a v klinických studiích denní léčba plazmatem snížila počty bakterií u chronicky infikovaných ran. Do budoucna se nízkoteplotní plazma díky jeho vlastnostem, jeví jako potenciálně vhodná alternativa k léčbě hojení kožních ran či chronických kožních defektů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

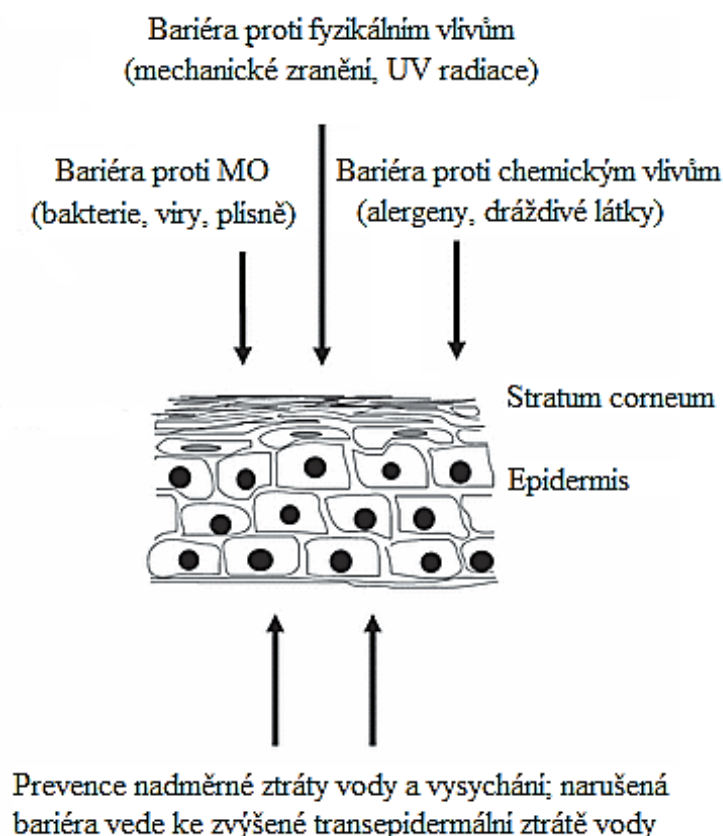
Říká se, že my lidé nosíme své zdraví na kůži. Nejen náš fyzický, ale také psychický stav ovlivňuje její vzhled. Kůže má, jako náš největší orgán, několik zásadních funkcí. Je první linií v boji proti infekci a zranění. Poskytuje nám bariéru proti ztrátě vody, patogenům a chrání nás před různými vnějšími vlivy, včetně tepelného, chemického a ultrafialového záření. Kůže udržuje naše tělo v kontaktu s okolním prostředím prostřednictvím řady nervových zakončení, reguluje tělesnou teplotu a také kupříkladu syntetizuje vitamin D [1][2].

Kůže a její různé složky mají schopnost komunikace s jinými tkáněmi a samoregulace prostřednictvím produkce cytokinů, neurotransmiterů, hormonů a jejich odpovídajících receptorů. Tyto neuro-imuno-endokrinní funkce jsou úzce propojeny s centrálními regulačními systémy. Kůže je také obrovským rezervoárem kmenových buněk důležitých pro hojení ran [3].

Pochopit všechny faktory, které ovlivňují stav naší pokožky, není jednoduché a je důležité získávat stále nové poznatky o jejím fungování. Postupem času se konečně přišlo i na to, že ne všechny bakterie, plísňe a viry osídlující kůži ovlivňují negativně její funkce. Je až neuvěřitelné, jaký má naše kůže regenerační potenciál. Ve snaze vědců je ale stále získávat nové poznatky a zdokonalovat se např. v léčbě popálenin nebo hlubokých ran [1].

2.2 Kožní bariéra

Nejdůležitější funkcí pokožky je schopnost tvořit účinnou bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím organismu (viz Obrázek 1). Epidermis zahrnuje fyzikální, chemickou, biochemickou (antimikrobiální a vrozená imunita) a adaptivní imunologickou bariéru. Fyzikální bariéra se skládá hlavně ze stratum corneum, ale i ze spojení buňka-buňka související s cytoskeletálními proteiny. Chemická a biochemická (antimikrobiální, vrozená imunita) bariéra se skládá z lipidů, kyselin, hydrolytických enzymů, antimikrobiálních peptidů a makrofágů. Adaptivní imunologická bariéra se skládá z humorálních (protilátky) a buněčných složek (bílé krvinky) imunitního systému. Kůže svou strukturou a složením vytváří účinnou bariéru, která brání invazi různých mikroorganismů do našeho těla, brání nás také před chemickými vlivy (alergeny a dráždivými látkami), mechanickým poškozením, UV zářením, a zabráňuje neregulovaným ztrátám vody a rozpuštěných látek [4].



Obrázek 1: Znárodnění bariérové funkce kůže [4]

UV záření je jak mutagenem, tak i nespecifickým poškozujícím jevem. Má vlastnosti jak iniciátoru nádoru, tak jeho promotoru. UV záření je rizikovým faktorem pro vznik rakoviny kůže a mnoho dalších kožních chorob. UV však také prospívá lidskému zdraví tím, že zprostředkovává přirozenou syntézu vitamínu D a endorfinů v kůži, proto má UV na lidské zdraví komplexní a smíšené účinky. Nadměrné vystavení UV záření však s sebou nese závažná zdravotní rizika, včetně pigmentových skvrn, vrásek a zhoubných nádorů. Keratinocyty akumulují melaninové pigmenty v průběhu jejich zrání a epidermální melanin účinně blokuje pronikání UV záření do kůže. Ačkoli melanin lze v epidermálních keratinocytech nalézt v hojném množství, v těchto buňkách se netvoří. Syntéza melaninu je omezena na melanocyty, které jsou odvozeny z neurální lišty (embryonální buněčná oblast, jež je přítomna pouze u obratlovců) a jsou druhou nejhojnější buňkou v epidermis [6].

Kůže slouží jako silná bariéra, která nás chrání před napadením patogeny a škodlivými organismy. Důležitá část této bariéry pochází z antimikrobiálních peptidů (AMP), což jsou malé peptidy hojně exprimované v kůži. AMP jsou produkovány v hlubších vrstvách epidermis a transportují se do vrstvy stratum corneum, kde hrají zásadní roli v první linii obrany proti potenciálním patogenům. Existuje mnoho AMP a mají širokou antibiotickou aktivitu proti bakteriím, houbám a virům. Působí také jako multifunkční efektorové molekuly, které spojují vrozené a adaptivní imunitní reakce. AMP hrají zásadní roli při udržování optimální a funkční kožní bariéry – nejen přímým ničením patogenů, ale také vyvážením imunitních odpovědí a interferencí s hojením ran, diferenciací buněk, reepitelizací a jejich synergickým působením na kožní mikrobiotu [5].

2.3 Struktura kůže

Kůže se skládá ze tří vrstev: epidermis, dermis a podkožní tkáň (viz Tabulka 1). Nejsvrchnější vrstva zvaná epidermis, se skládá ze specifických buněk známých jako keratinocyty, které syntetizují keratin, dlouhý vláknitý protein s ochrannou funkcí. Střední vrstva, dermis, je v zásadě tvořena fibrilárním strukturním proteinem kolagenem. Dermis leží na podkožní tkáni, která obsahuje malé laloky tukových buněk známých jako lipocyty [6].

Tloušťka těchto vrstev se značně liší, v závislosti na části těla. Nejtenčí vrstva epidermis se nachází na víčkách a její tloušťka je menší než 0,1 mm, zatímco dlaně a chodidla mají nejsilnější vrstvu epidermis, měřící přibližně 1,5 mm [6].

Tabulka 1: Skladba kůže [7]

vrstva kůže	skladba	funkce
epidermis	dlaždicový epitel	imunitní obrana
	keratinocyty	UV ochrana
	melanocyty	pigmentace
	Langerharsovy buňky	ochrana proti MO
	Merkelovy buňky	termoregulace
dermis	kolagenní vlákna	ohybnost
	fibroblasty	
	fagocyty	pevnost v tahu
	lymfocyty	
	Langerharsovy buňky	pružnost
	žírné buňky	
podkožní tkáň	subkutánní tuk	izolace
		kalorická rezerva
		tlumení nárazů

2.3.1 Epidermis

Epidermis je stratifikovaný keratinizovaný epitel převážně tvořený keratinocyty, který je dále rozdělen do čtyř vrstev: bazální (*stratum basale*), trnité (*stratum spinosum*), zrnité (*stratum granulosum*) a zrohovatělé (*stratum corneum*), což je nejsvrchnější vrstva. Bazální vrstva leží na bazální membráně. Skládá se z mitoticky aktivních buněk keratinocytů, které proliferují, migrují a postupně se diferencují za vzniku stratifikované epidermis. Jak se tyto buňky pohybují směrem k povrchu a diferencují se do trnité vrstvy, ztrácejí schopnost dělení, zvětšování a navazování silných mezibuněčných spojení [8].

Epidermis je tedy dynamická a samoobnovující se tkáň, ve které je deskvamace neboli odlučování svrchních buněk na *stratum corneum* vyvážena růstem buněk ve spodních vrstvách epidermis. Epidermální buňky v bazální vrstvě, keratinocyty, se množí, začínají se diferencovat a poté migrují směrem k povrchu kůže. Terminální diferenciací nastává na rozhraní *stratum*

granulosum a *stratum corneum*, během které jsou životaschopné keratinocyty transformovány do korneocytů (zploštělé mrtvé buňky naplněné keratinovými vlákny a vodou) [9][10].

Keratinocyty jsou převládajícím buněčným typem pokožky a jsou tvořeny v bazální vrstvě, produkují keratin a jsou odpovědné za tvorbu vodní bariéry epidermis tvorbou a vylučováním lipidů. Keratinocyty také regulují absorpci vápníku aktivací prekursorů cholesterolu UVB zářením za vzniku vitaminu D [11].

Melanocyty primárně produkují melanin, který je zodpovědný za pigment pokožky. UVB světlo stimuluje sekreci melaninu, který chrání před UV zářením a funguje jako vestavěný opalovací krém [11].

Langerhansovy buňky jsou dendritické buňky, obránci první linie kůže a hrají významnou roli v prezentaci antigenu. Tyto buňky jsou mesenchymálního původu, odvozené z kmenových buněk kostní dřeně a jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému. Obsahují tzv. Birbeckova granula, cytoplazmatické organely ve tvaru tenisové rakety [11].

Merkelovy buňky jsou oválné epidermální buňky, které se nacházejí přímo nad bazální membránou. Tyto buňky mají smyslovou funkci jako mechanoreceptory pro lehký dotek a jsou nejvíce rozšířené na konečcích prstů. Jsou vázány na sousední keratinocyty pomocí desmosomů a jejich membrány interagují s volnými nervovými zakončeními v kůži [11].

2.3.2 Dermis a podkožní tkáň

Dermis je vrstva pojivové tkáně mezenchymálního původu umístěná pod pokožkou a zároveň nad vrstvou podkožního tuku. Složení dermis je hlavně vláknité, skládající se jak z vláken kolagenu, tak z elastických vláken. Mezi vláknitými složkami leží amorfní extracelulární látka obsahující glykosaminoglykany, jako je kyselina hyaluronová, proteoglykany a glykoproteiny. V dermis jsou umístěny krevní cévy, nervová zakončení, vlasové folikuly a žlázy. V pojivové tkáni dermis se nachází mnoho typů buněk, včetně fibroblastů, makrofágů, adipocytů, žírných buněk, Schwannových buněk a kmenových buněk. Fibroblasty jsou hlavním typem buněk v dermis [12].

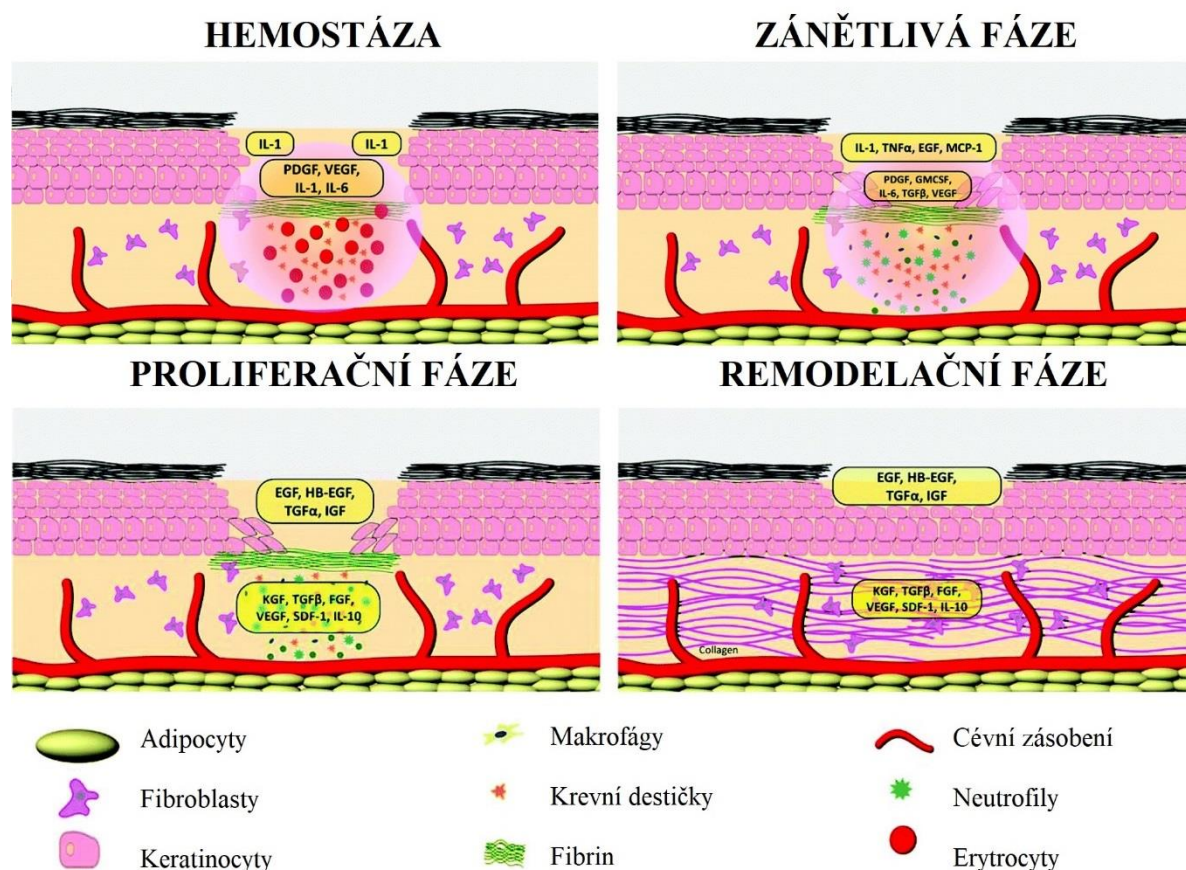
Hluběji pod dermis leží podkožní tkáň (mezi kůží a povázkou neboli fascií). Funguje jako klouzavá plocha mezi těmito strukturami, čímž chrání hlubší oblasti před akutním a chronickým poškozením. Dále také ukládá tuk a podílí se na regulaci teploty. Podkožní tkáň je tvořena sítí přepážek pojivové tkáně a tukových lalůčků. Velikost a rozsah těchto přepážek se na různých místech těla liší. Tloušťka podkožní tkáně se velmi liší v závislosti na množství tuku obsaženého uvnitř. V některých oblastech těla, jako je hřbetní strana ruky, je zastoupení tuku nízké, zatímco v jiných oblastech, jako jsou stehna a hýždě je větší množství tuku. Distribuce podkožního tuku také souvisí s pohlavím a genetickými predispozicemi [13].

2.4 Proces hojení kožních ran

Hojení ran je komplexním a dynamickým mechanismem představujícím evoluční výhodu důležitou nejen pro savce. Hojení kůže je díky jejím životně důležitým funkcím, jako je fyzikální, chemická a mikrobiální bariéra velmi důležitým dějem zakončeným finálním zacelením rány. Fyziologická regulace hojení kožních ran je složitý proces, který závisí na mnoha typech buněk a mediátorech, interagujících ve vysoce organizované časové sekvenci.

Ačkoli existuje řada kvalitní literatury, týkající se mechanismů hojení ran, vědci si stále nepřestávají pokládat další otázky [14].

Obecně lze proces hojení ran rozdělit do čtyř prolínajících se fází (viz Obrázek 2): hemostáza, zánětlivá fáze, proliferační fáze a fáze zrání (remodelační fáze) [15].



Obrázek 2: Fáze hojení[16]

2.4.1 Hemostáza

Hemostáza je první a krátká počáteční fáze, nastávající rovnou po zranění nebo porušení celistvosti kůže. Poranění traumatizuje cévy, což má za následek krvácení. Narušená buněčná membrána endotelu uvolní fosfolipidy, které jsou transformovány do kyseliny arachidonové a jejich metabolitů, které regulují tlak v cévách a jejich propustnost. Periferní vazokonstrikce trvající 5 až 10 minut zamezí krvácení, ale zároveň omezí přísun kyslíku a živin do okolní tkáně. Nedostatek kyslíku a zvýšená glykolýza, stejně jako změny pH jsou tělu prospěšné, protože zvyšují aktivaci, adhezi a agregaci krevních destiček. Tím se zahájí vnitřní koagulační kaskáda, a to prostřednictvím krevních destiček, které vytvoří sraženinu. Tato sraženina má několik funkcí. Tvoří provizorní matici bohatou na fibrin (vláknitý nerozpustný protein), fibronektin (adhezivní glykoprotein), vitronektin (adhezivní glykoprotein) a trombospondin (agregační glykoprotein), vyplňuje prostor vytvořený ranou a slouží jako scaffold pro migraci buněk [17].

Aktivované krevní destičky jsou jedny z prvních promotorů zánětu skrze uvolňování silných chemoatraktantů a mitogenů (faktory ovlivňující zahájení mitózy) z jejich zásobních granulí. Mediátory uvolňované nejen krevními destičkami, ale také žírnými buňkami upravují vaskulární tlak a propustnost, která se zvyšuje během 5 až 10 minut od zranění (zarudnutí, horkost a otok rány), a tím také zvyšují buněčnou migraci, difúzi živin a kyslíku potřebného k udržení nově přicházejících buněk. Postupem času se sraženina na povrchu vysuší a vytvoří tak strup, který chrání ránu před infekcí. Tento strup je poté odloučen spolu s mrtvými zánětlivými buňkami a bakteriemi, jak hojení postupuje zespodu. Krevní destičky také uvolňují cytokiny např. růstový faktor odvozený od krevních destiček, který shromažďuje buňky, které se účastní v posledních fázích hojení. Po hemostáze nastává fáze zánětlivá [15][17][18].

2.4.2 Zánětlivá fáze

Zánětlivá fáze je zahájena uvolněním růstových faktorů a bioaktivních molekul, které aktivují akutní zánět a tím je naprogramována oprava tkáně. Trombocyty jsou aktivovány trombinem a degranulují, čímž se z granulí uvolní zánětlivé mediátory a růstové faktory. Zánětlivá fáze hojení rány může být rozdělena do rané fáze charakterizované příchodem neutrofilů a pozdní fáze charakterizované přítomností a transformací monocytů. Zánět připravuje ránu pro další fáze hojení. Čistí tělo od cizích látek a likviduje mrtvou tkáň, zatímco zúčastněné buňky uvolňují mediátory k rozvoji a udržení následujících procesů, které budou následovat. Intenzita zánětlivé odpovědi silně souvisí se závažností traumatu a určuje rozsah zjizvení [17][19][20].

Leukocyty jsou získávány z cirkulující krve, která dorazí na místo poškození díky četným vazoaktivním mediátorům a chemoatraktantům dodávaných koagulací, dráhami aktivovaného systému komplementu, trombocyty, mastocyty a poškozenými nebo aktivovanými stromálními buňkami. Tyto signály iniciují procesy aktivace, těsné přilnavosti, a nakonec transmigrace zánětlivých buněk přes endotel drobných cév. Chemoatraktanty také stimulují uvolňování enzymů pomocí aktivovaných neutrofilů, urychlujících jejich průnik vaskulárními bazálními membránami. Schopnost neutrofilů procházet cévní stěnou kapilár a vstupovat do přilehlých tkání je usnadněna zvýšenou kapilární propustností a uvolněním spektra látek rozšiřujících cévy. Příliv buněk začíná během několika minut a koncentrace neutrofilů v ráně se postupně zvyšuje a dosahuje vrcholu za jeden až dva dny po poranění [17][19].

Neutrofilů fungují jako první linie obrany v kontaminovaných ranách tím, že likvidují nečistoty a bakterie prostřednictvím fagocytózy, následných enzymatických mechanismů a kyslíkových radikálů. Migrace neutrofilů a fagocytóza je u konce, když jsou kontaminující částice odstraněny z místa poranění. Většina buněk se poté zachytí ve sraženině, která se během pozdějších fází hojení odloučí. Neutrofilů zůstávající v živé tkáni za několik dní odumírají a jsou fagocytovány tkáňovými makrofágy nebo modifikovanými fibroblasty v ráně, což značí konec časné zánětlivé fáze hojení [17][19].

Rychlý nárůst počtu makrofágů v zanícené tkáni je převážně způsoben migrací monocytů ze svalů, následovanou diferenciací monocytů na makrofágy, aby pomohly tkáňovým makrofágům na místě rány po dobu několika dnů až týdnů. Tímto způsobem se mohou adaptabilní pluripotentní monocyty měnit na makrofágy, jejichž funkční vlastnosti jsou určeny podmínkami, s nimiž se setkávají v místě poranění. Makrofágy hrají ústřední roli ve všech

fázích hojení ran a organizují celkový proces. Během časně zánětlivé fáze makrofágy vyvíjejí zánětlivé funkce, jako je prezentace antigenu, fagocytóza a produkce zánětlivých cytokinů i růstových faktorů, které usnadňují hojení. Když zánětlivá fáze neskončí včas a nastává chronický zánět, proces se může neregulovatelným, což má za následek patologické hojení rány a vytvoření fibrotické jizvy v místě poranění [17][19].

2.4.3 Proliferační fáze

Fáze proliferace začíná dva až tři dny po poranění. Nastává zde angiogeneze, tvorba extracelulární matrix a epitelizace. Hlavní úkolem proliferační fáze je tedy pokrytí povrchu rány, tvorbě granulační tkáně a obnovení vaskulární sítě. Začíná aktivací fibroblastů zánětlivými mediátory a růstovými faktory uvolněnými během zánětlivé fáze. Proces migrace fibroblastů z okraje rány do fibrinové sraženiny je iniciován růstovými faktory, které jsou generovány makrofágy odvozenými od monocytů. V této fázi kaskády hojení je tvorba nových růstových faktorů stěžejní, protože zásoby růstových faktorů krevních destiček, které byly uvolněny během zánětlivé fáze, jsou vyčerpány [19][20][21].

Granulační tkáň je tvořena třemi elementy, které se současně dostávají do rány: makrofágy, které likvidují i produkují mediátory, jako jsou cytokiny a růstové faktory, které stimulují angiogenezi a fibroplazii (chorobná tvorba vaziva); fibroblasty, které proliferují a syntetizují nové složky ECM, nové krevní cévy, které přenášejí kyslík a živiny potřebné pro metabolismus a růst buněk, a také udělují granulační tkáni svůj charakteristický červený, zrnitý vzhled. Granulační tkáň se skládá převážně z fibroblastů a nových krevních cév. Dva základní procesy, prozatímni tvorba matrix a tvorba nových krevních cév (angiogeneze), fungují souběžně. Kyslík je důležitý pro fibroblasty, aby byly schopny produkovat kolagen a vytvořily tak granulační tkáň. Obnovení cévního zásobení je tedy klíčovým krokem omezujícím rychlost procesu hojení. Byla identifikována široká škála růstových faktorů a chemických mediátorů, které ovlivňují vznikající kapiláry. Patří mezi ně faktory odvozené od makrofágů, jako jsou TGF- β 1, PDGF, VEGF a FGF [17][20].

V raně zpočátku fibroblasty produkují kolagen třetího typu, který poskytuje slabší a méně intenzivně zesílenou tkáňovou matrix než kolagen prvního typu nepoškozené nebo zralé obnovené tkáně. Kolagen třetího typu stabilizuje formující se granulační tkáň, ale je lépe uzpůsoben pro migraci fibroblastů, endoteliálních a imunitních buněk. To usnadňuje znovuosídlení granulační tkáně životaschopnými buňkami. Kolagen třetího typu je v matrix nahrazen kolagenem prvního typu, když hojení postupuje od proliferace k remodelaci. Ke konci proliferační fáze jsou fibroblasty řízeny signály makrofágů, převážně TGF- β 1, k transdiferenciaci na myofibroblasty. Myofibroblasty jsou specializované buňky, které generují novou matrix, ale také se stávají stažitelnými díky expresi aktinu hladkého svalstva. Stažitelnost je důležitá, protože poskytuje mechanickou pevnost granulační tkáni a zmenšuje velikost rány [20].

Zajímavou vlastností myofibroblastů je, že kontrakce spouští tvorbu faktoru TGF- β 1, vede k přeměně dalších fibroblastů a zvyšuje produkci kolagenu prvního typu z myofibroblastů. Na konci této fáze je tedy počet dozrávajících fibroblastů snížen diferenciací myofibroblastů a ukončen následnou apoptózou. Nová kolagenová vlákna prvního typu se ukládají ve svazcích,

posilují tkáň, aby odolávala mechanickému smykovému namáhání. V této fázi hojení ran začínají myofibroblasty degradovat prozatímní matrix kolagenu třetího typu působením matrixových metaloproteináz, což znamená přechod z fáze proliferace do fáze remodelace, kde granulační tkáň dozrává do jizvy [19][20].

2.4.4 Fáze zrání (remodelace)

Remodelace je poslední fázi hojení ran a probíhá od dvacátého prvního dne do jednoho roku po poranění. Tvorba granulační tkáně je zastavena apoptózou buněk. Vyznačuje se kontrakcí rány a remodelací kolagenem. Makrofágy jsou hlavním buněčným typem v proliferační fázi a fibroblasty jsou hlavním buněčným typem v remodelační fázi [19][21].

Během zrání rány procházejí složky ECM určitými změnami. Kolagen třetího typu, který byl produkován v proliferativní fázi, je nyní nahrazen silnějším kolagenem prvního typu. Myofibroblasty způsobují kontrakce ran jejich vícenásobným připojením ke kolagenu a pomáhají zmenšovat povrch vyvíjející se jizvy. Kromě toho angiogenní procesy ustávají, průtok krve v ráně klesá, akutní metabolická aktivita v ráně se zpomaluje, a nakonec se zastaví. Epidermis výsledné jizvy se liší od neporaněné kůže po hojení ran díky nedostatku tzv. rete pegs (výběžků epidermis), které jsou za normálních podmínek ukotveny v podkladové matici pojivové tkáně a jsou odpovědné za těsné spojení epidermis s dermis [19].

2.5 Role keratinocytů v procesu hojení ran

Keratinocyty, jako hlavní buněčná složka epidermis, jsou nejen důležité pro zachování kožní bariéry, ale také pro její obnovu při poranění procesem známým jako reepitelizace. Reepitelizace je definována jako proces znovupokrytí obnaženého povrchu epitelu. Pro úspěšné uzavření rány jsou nezbytné buněčné a molekulární procesy, které se účastní právě iniciace, průběhu a ukončení reepitelizace [22].

V první vrstvě, která pokrývá ránu, začnou keratinocyty proliferovat, aby byl zajištěn dostatečný přísun buněk k uzavření rány. Regulace proliferace keratinocytů závisí na dostupnosti růstových faktorů, stupni buněčné diferenciaci a dostupnosti živin. Schopnost proliferovat mají pouze bazální keratinocyty, zatímco terminálně diferencované keratinocyty tuto schopnost ztrácejí. V proliferačním procesu během epitelizace hraje hlavní roli spektrum růstových faktorů (EGF, TGF α a KGF). Synergie mezi růstovými faktory, ECM (extracelulární matrix) a integriny (membránovými receptory) hraje klíčovou roli v regulaci proliferace keratinocytů během reepitelizace. Jakmile je rána zahojena, definována jako plně epitelizovaná a pokrytá vrstvou keratinocytů, proliferační signály ustávají a začíná proces stratifikace (vytváření vrstev) [22].

2.6 Plazma

Termín plazma poprvé použil Irving Langmuir v roce 1928 a popisuje kvazi-neutrální ionizovaný nebo částečně ionizovaný plyn v elektrickém výboji. Plazma, nazývané také jako čtvrté skupenství hmoty, je tedy tvořeno z různých částic, neutrálních atomů a molekul, nabitých částic (elektronů a iontů), metastabilních částic (excitovaných atomů a molekul, radikálů) a fotonů. Jedná se tedy o velmi reaktivní prostředí, které je potenciálně zajímavé pro využití v mnoha odvětvích a aplikacích. Plazma je vytvořeno aplikací elektřiny na plyn.

Elektrony jsou zahřívány aplikovaným elektrickým polem a aktivují molekuly plynu excitací, ionizací, disociací, vytvářejí výše uvedené druhy částic [23][24].

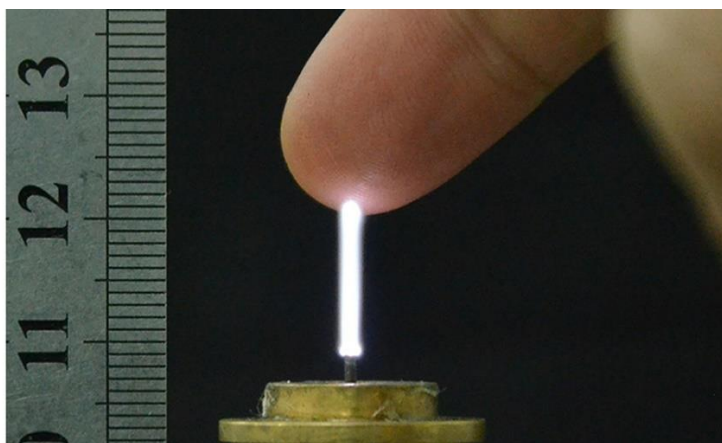
V závislosti na teplotě částic lze plazma rozdělit do dvou kategorií: rovnovážné nebo termální plazma (všechny částice mají stejnou energii) a nerovnovážné nebo netermální plazma (elektrony mají mnohem vyšší energii než ostatní částice). Termální plazma je charakterizováno téměř úplně ionizovaným plynem a vysokou teplotou alespoň 15 000 K. Netermální nebo studené plazma je částečně ionizovaný plyn s teplotou obecně blízkou pokojové teplotě (max. 340 K). Bylo již vyvinuto několik typů studeného plazmatu. Studené plazma za atmosférického tlaku (CAPP) se často používá při lékařských ošetřeních nebo při konzervování rostlin a potravin [24].

Nízkoteplotní plazma je částečně ionizovaný plyn obsahující různé ionty, elektrony, aktivní molekuly, elektrická pole a UV záření. Netepelné a nerovnovážné vlastnosti LTP přitahují pozornost biomedicínských vědců. V současné době je LTP široce používáno při srážení krve, dezinfekci a hojení ran, sterilizaci chirurgických nástrojů a lékařských materiálů a léčbě nádorů [25].

Bylo zjištěno, že nízkoteplotní plazma může být aplikováno přímo na zdravou lidskou tkáň k ničení patogenních mikroorganismů, k dezinfekci krytů ran, k selektivnímu usmrcení rakovinných buněk, ke sterilizaci teplocitlivých materiálů, a hlavně k urychlení procesu hojení ran [26].

2.6.1 Nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku

Pro vytvoření nízkoteplotního plazmatu za atmosférického tlaku již bylo použito několik metod generování plazmového výboje, například výboj střídavým či stejnosměrným proudem, vysokofrekvenční, mikrovlnný nebo pulzní výboj. Ve srovnání s plazmatem generovaným vysokofrekvenčním a nízkofrekvenčním výbojem, plazma generované mikrovlnami má několik výhod jako např. vysokou hustotu elektronů a reaktivních látek, nízkou poruchovost a dlouhou životnost elektrod. Tyto výhody jsou skvělé pro využití mikrovlnného plazmatu v nově vznikajících aplikačních oblastech při zpracování materiálů a lékařských i biomedicínských aplikacích [26].



Obrázek 3: Plazmová tryska v kontaktu s lidskou kůží [27]

Nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku indukuje biologické procesy generováním reaktivních kyslíkových a dusíkových částic, které jsou vhodné pro různé biologické aplikace jako je hojení ran, sterilizace nebo programovaná smrt buňky. Většina nových metod je založena na dielektrických bariérových výbojích nebo na vysokofrekvenčních výbojích. V těchto zařízeních se obvykle používá jako pracovní plyn helium, což je velmi nákladné. Zdroj mikrovlnného plazmatu buzeného povrchovou vlnou umožňuje přímý kontakt s aktivní částí výboje, což umožňuje krátkodobě existujícím částicím přímo interagovat s povrchem. Plazma je v tomto případě součástí struktury vlnovodu, která zahrnuje mikrovlnný generátor spojený se zařízením jménem surfatron. Výboj je generován v argonu, proudícím křemíkovou trubicí v rezonátoru surfatronu, pohybující se elektromagnetickou vlnou, která se šíří podél hranice plazma-dielektrikum (křemenná trubice nebo okolní vzduch). Výsledný plazmový hořák má délku úměrnou k aplikované energii a toku plynu. V tomto případě je plazmový sloupec axiálně nehomogenní z důvodu disipace v elektromagnetické vlně. Elektrony absorbují vlnovou energii, což vede k excitaci a ionizaci neutrálních atomů a iontů, čímž se snižuje energie vlny podél plazmového hořáku. Velmi důležitá je geometrie křemenné trubice pro šíření vln a rozptyl energie, což je předmětem dalšího zkoumání [28].

2.6.2 Účinky nízkoteplotního plazmatu na hojení ran

Nízkoteplotní plazma (LTP) je tvořeno elektrickým výbojem v proudu argonu nebo hélia za atmosférického tlaku při pokojové teplotě a skládá se z elektrických polí, různých reaktivních částic a emise UV záření, které je zodpovědné za mnoho biologických účinků. Dle studií není léčba nízkoteplotním plazmatem v nízkých dávkách nebezpečná, a naopak indukuje proliferaci endoteliálních buněk, zatímco delší expozice vedou k buněčné smrti. Navíc byl systematicky zkoumán jeho terapeutický potenciál pro hojení ran a bylo prokázáno, že léčba LTP moduluje buněčné parametry relevantní pro hojení ran, jako je podpora hybnosti buněk in vitro, indukce genové a proteinové exprese cytokinů pro hojení ran a produkce angiogenních faktorů [29].

Několik studií na zvířatech navíc prokázalo zrychlené hojení ran po léčbě LTP na základě stimulace zánětlivých odpovědí. Kromě toho v klinických studiích denní léčba plazmatem významně snížila počty bakterií u chronicky infikovaných ran a zlepšila reepitelizaci, při níž bylo pozorováno méně krevních sraženin a fibrinových vrstev, bez jakéhokoli zánětu v ráně. Zatímco vývoj aplikací nízkoteplotního plazmatu se přiblížil klinickým aplikacím, mechanismy, které jsou základem jeho účinků na savčí buňky a tkáně během hojení ran, nejsou zcela známy. Některé studie ukazují, že pacienti léčení pomocí LTP nebo bez LTP měli podobné výsledky zmenšení velikosti rány a bakteriální redukce. Použití LTP k léčbě ran je bezpečné, ale současné důkazy ukazují, že při péči o rány při současných fyzikálních parametrech plazmy neexistuje žádný klinický přínos LTP. Budoucí studie musí zahrnovat technické podrobnosti o použitých zdrojích LTP. Z pokusů na myších, kterým byla uměle vytvořena rána, byl také učiněn závěr, že vhodné dávky LTP by mohly inaktivovat bakterie kolem rány, aktivovat proliferaci fibroblastů v ráně a celkově podporovat hojení ran. Naopak, nadměrné dávky LTP potlačují hojení ran způsobením apoptózy nebo nekrózy buněk. Pozitivní i negativní účinky LTP na hojení kožních ran u myší souvisely s existencí reaktivních forem kyslíku a dusíku v proudu plazmatu, které byly detekovány optickou emisní spektroskopií [29][30][31].

Za posledních 10 let byly pro oblast medicíny postupně vyvíjeny aplikace plazmatu. Ukázalo se, že LTP je antibakteriální, indukuje migraci, proliferaci dermálních buněk a moduluje redoxní signalizaci během regenerace rány. Než se však plazma stane zdravotnickým prostředkem, měla by se dále hodnotit její účinnost a bezpečnost jak na buněčné úrovni, tak na úrovni organismu [29].

LTP se také používá pro povrchovou dezinfekci. Ukázalo se, že ošetření pomocí LTP má schopnost inhibovat grampozitivní (*S. aureus*) i gramnegativní (*E. coli*) bakterie na pevných a porézních površích. Data naznačují, že reaktivní formy kyslíku jsou klíčovými mediátory baktericidních účinků LTP, a že bakterie vystavené LTP nevyvíjejí rezistenci na další léčbu pomocí LTP. Ukázalo se, že LTP vyzařuje malé množství UV záření, ale předpokládá se, že dávka není dostatečná k poškození cíleného ošetřeného vzorku a že většina fotonů (<180 nm) je absorbována do vzduchu [29][30][31].

Pomocí konvenčních plynů, jako je vzduch nebo argon, je možné ve velmi krátké době připravit s LTP reaktivní formy kyslíku a reaktivní formy dusíku, ozon, oxidy a peroxidy. Kromě toho netermální plazma účinně produkuje ultrafialové záření v oblasti UVC a vakuové ultrafialové VUV záření, které má silné antimikrobiální účinky [32].

Pokud jde o migraci buněk, zjistilo se, že ošetření pomocí nízkoteplotního plazmatu zvýšilo buněčnou migraci v tzv. scratch testu. Výsledky většiny experimentů studie naznačují, že došlo k lepšímu uzavření rány ve scratch testu u buněčných monovrstev, které byly ošetřeny plazmovým výbojem. Zdá se ale, že lepší uzavření rány je způsobené spíše stimulovanou migrací než proliferací [33].

2.6.3 Výhody použití nízkoteplotního plazmatu

Nízkoteplotní plazma má významný potenciál pro široké použití v klinické praxi. Aplikace nízkoteplotního plazmatu je prospěšná v mnoha oblastech medicíny bez významného negativního vlivu na zdravé buňky. Aplikace LTP však může produkovat potenciálně škodlivé prvky, a proto musí být aplikováno pod odborným vedením a vhodným způsobem. Předpokládá se, že použití LTP časem nebude omezeno pouze na povrchové struktury, protože technologický pokrok pravděpodobně umožní vývoj stále menších zařízení schopných aplikovat plazmové výboje právě na vnitřní struktury. Tyto možnosti LTP by s největší pravděpodobností uspěly při léčbě vnitřních tkání organismu. Potenciální zavedení LTP v běžné klinické praxi v regenerativní medicíně a onkologii by mohlo významně snížit finanční zátěž a náklady na tyto léčby. A co je nejdůležitější, režim léčby LTP bude pro pacienty méně invazivní a stresující. Expoziční čas ošetření trvá několik sekund až minut podle druhu ošetřované oblasti a defektu a zařízení plazmových trysek není náročné na obsluhu [34].

Bylo prokázáno, že LTP může interakcí reaktivních částic poškodit membrány bakteriálních buněk, což vede k baktericidnímu účinku. Interakce je zprostředkována krátkodobými reaktivními druhy. LTP nezpůsobuje tepelné ani chemické poškození ošetřeného povrchu, což představuje výhodu oproti běžným sterilizačním technikám [35].

2.7 Buněčná linie HaCaT

Buněčná linie HaCaT je dlouhotrvající, spontánně immortalizovaná (znesmrtelněná) lidská keratinocytová linie, která je schopna diferencovat *in vitro*. Buňky HaCaT mohou být užitečným modelem pro vyšetřování protizánětlivých intervencí nebo terapií při léčbě kožních onemocnění. HaCaT je netumorigenní monoklonální buněčná linie, přizpůsobená pro dlouhodobý růst bez doplňujících růstových faktorů, vykazuje normální morfogenezi a disponuje všemi hlavními povrchovými markery a funkční aktivitou izolovaných keratinocytů [36].

Buňky linie HaCaT mohou také tvořit stratifikovanou epidermální strukturu, ale mohou se vracet tam a zpět mezi diferencovaným a bazálním stavem při změnách koncentrace vápenatých iontů v médiu. Zachovávají si schopnost znovu sestavit dobře strukturovanou pokožku po transplantaci *in vivo*. HaCaT se běžně kultivují v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého při teplotě 37 °C v běžném médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) obsahujícím 1,8 mM vápenatých iontů. Je zde také přidáváno 10 % FBS (fetální bovinní sérum) a antibiotika [36].

2.8 Testování cytotoxicity *in vitro*

Testy cytotoxicity *in vitro* jsou preferovány jako důležité indikátory pro hodnocení toxicity zdravotnických prostředků, léčebných metod, léčiv aj. na lidské tkáň, protože jsou jednoduché, rychlé, mají vysokou citlivost a můžou předcházet toxickým účinkům při *in vivo* testování [37].

Cytotoxicita je jedním z nejdůležitějších indikátorů pro biologické hodnocení *in vitro* studií. Chemické látky, jako jsou léky a pesticidy, mají různé mechanismy cytotoxicity, jako je destrukce buněčných membrán, zabránění syntézy bílkovin, nevratná vazba na receptory atd. Aby bylo možné určit stav buněčné smrti způsobený těmito mechanismy, je zapotřebí levné, spolehlivé a reprodukovatelné metody. V současné době se v oblasti toxikologie a farmakologie používá široké spektrum testů cytotoxicity např. testy vyloučení barviv, kolorimetrické testy, fluorometrické a luminometrické testy. Výběr vhodné metody je důležitý pro získání přesných a spolehlivých výsledků. Při výběru testů cytotoxicity a životaschopnosti buněk, které mají být použity ve studii, je třeba vzít v úvahu různé parametry, jako je dostupnost v laboratoři, místo, kde má být studie provedena, testované sloučeniny, detekční mechanismus, specifická a senzitivita [37][38].

2.8.1 MTT test

Test MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid] je jedním z nejčastěji používaných kolorimetrických testů k hodnocení cytotoxicity nebo životaschopnosti buněk. Tento test určuje životaschopnost buněk stanovením mitochondriální funkce buněk měřením aktivity mitochondriálních enzymů, jako je sukcinát dehydrogenáza. MTT je redukováno NADH na fialový formazan. Formazan lze kvantifikovat absorpcí světla při specifické vlnové délce. Tato metoda je snadno použitelná, bezpečná, má vysokou reprodukovatelnost a je široce používána pro stanovení jak životaschopnosti buněk, tak testů cytotoxicity [38].

Bohužel je ale formazan nerozpustný ve vodě a v buňkách tvoří fialové krystalky. Před měřením absorbance je nutné použít k solubilizaci krystalů organické rozpouštědlo, jako je dimethylsulfoxid (DMSO) nebo isopropanol. Cytotoxicita formazanu navíc znesnadňuje odstraňování buněčného kultivačního média z jamek destičky kvůli plovoucím buňkám

s krystalky formazanu, což vede k významným chybám při měření. K MTT testu jsou používány většinou 96jamkové destičky, kdy jsou absorbance v jednotlivých jamkách vyhodnocovány čtečkou ELISA reader při vlnové délce 570 nm. Procento životaschopných buněk je vypočteno pomocí následující rovnice (2.1) [38][39]:

$$N (\%) = [100 \times (A_{\text{vzorek}}) / (A_{\text{kontrola}})] \quad (2.1)$$

2.8.2 LDH test

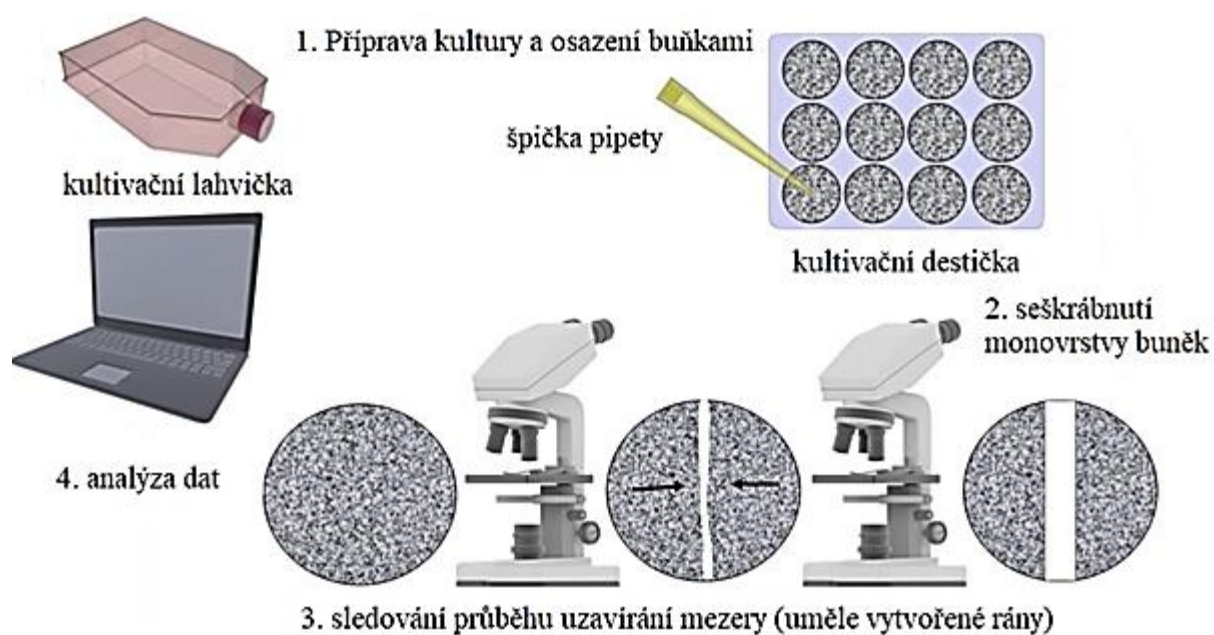
LDH (laktátdehydrogenáza) je stabilní cytosolický enzym přítomný v buňkách savců, který se vyplavuje z buněk po jejich poškození nebo po prasknutí plazmatické membrány. Toto stanovení je založeno na kvantifikaci aktivity enzymu LDH v kultivačním médiu. LDH test může být použit k přímému vyhodnocení cytotoxicity měřením uvolňování LDH z mrtvých nebo vážně poškozených buněk. Dále také můžeme spočítat celkový počet buněk nebo počet přežívajících buněk (po odstranění mrtvých buněk) [40].

Základním principem testu je to, že LDH uvolněná do růstového média (z poškozených nebo mrtvých buněk) katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát a převádí NAD^+ na NADH. NADH v přítomnosti diaforázy transformuje žlutou tetrazoliovou sůl na červený formazan. Úroveň barevné změny je úměrná množství uvolněného LDH, a tedy rozsahu buněčné smrti a poškození membrány. Tento formazan je ve vodě rozpustný a detekovatelný při vlnové délce 490 nm [40][41].

2.9 Testování průběhu hojení rány pomocí scratch testu

Scratch test se obvykle používá ke kvantifikaci buněčné migrace na dvourozměrných površích v průběhu času při různých ošetřeních. Jedná se o jeden z nejčastěji používaných *in vitro* testů hojení ran [42].

Buňky jsou kultivovány do stavu konfluency v monovrstvě, pomocí špičky pipety se monovrstva seškrábne a vytvoří se mezera podobná řezu (viz Obrázek 4). Dlouhá osa hrotu je vždy kolmá na dno jamky. Výsledná vzdálenost mezery se rovná vnějšímu průměru hrotu. Po poškrábání je jamka promyta čerstvým médiem, aby se odstranily oddělené buňky. Tato oblast je pozorována v definovaných časových intervalech, migrace buněk je poté kvantifikována a vyjádřena jako průměrné procento zacelení poškrábané oblasti [42][43].



Obrázek 4: Schéma průběhu scratch testu [44]

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo zpracování rešerše na danou problematiku, experimentální ověření možnosti aplikace nízkoteplotního plazmatu při urychlení procesu hojení ran na buněčné linie kožních buněk HaCaT a vyhodnocení výsledku experimentální části s diskusí. V rámci práce byly tedy řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Aplikace nízkoteplotního plazmatu na humánní kožní buňky
- 3) Vyhodnocení výsledků a diskuse

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

- automatické pipety různých objemů, HTL (Polská republika)
- automatické pipety různých objemů, Biohit (Finsko)
- Airstream Biohazard box třídy II, ESCO (Singapur)
- CelCulture® CO₂ inkubátor, ESCO (Singapur)
- univerzální chlazená centrifuga, Hermle (Německo)
- inverzní mikroskop I-101 Infinity Trinocular, LW Scientific (Georgia)
- BioVID HD-720p Video Camera, LW Scientific (Georgia)
- EpochMicroplate Spectrophotometer, BioTek (USA)
- malý inkubátor pro Life Science aplikace s teploměrem, Labnet (USA)

4.2 Použité chemikálie

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose), Sigma-Aldrich (USA)
- Dodecylsírán sodný, Serva (Německo)
- MTT, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)
- FBS fetální bovinní sérum, HyClone (USA)
- Trypsin, Versene EDTA, Carl Roth (Německo)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Vitrum-LachNer (Česká republika)
- Chlorid sodný p.a., Vitrum-LachNer (Česká republika)
- Antibiotic-Antimycotic 100X (Biosera), Biotech (Německo)
- Pyruvát sodný, WVR (USA)
- NADH, WVR (USA)
- 2,4-dinitrofenylhydrazin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Kyselina chlorovodíková, odměrný roztok 0,1 M (N/10), Penta (Česká republika)
- Hydroxid sodný (perličky), INCHEMA (Česká republika)

4.3 Použité buňky

- humánní buňky HaCaT Human keratinocytes cell line, ze sbírky buněčných kultur Cell Lines Service, Eppelheim (Německo)

4.4 Práce s kožními buňkami

Kožní buňky linie HaCaT jsou velmi náchylné ke kontaminaci, proto je nutné dodržovat striktně sterilní pravidla.

4.4.1 Příprava média pro kultivaci buněk HaCaT

Do lahve komerčního média DMEM bylo přidáno 50 ml FBS a poté 5 ml roztoku antibiotik. Vždy byl tedy použit přídavek 10 % FBS a 1 % ATB k původnímu objemu lahve s médiem (500 ml).

4.4.2 Kultivace buněk

Do sterilní centrifugační zkumavky bylo v laminárním boxu odlito 5 ml PBS ze zásobní lahvičky. Z hlubokomrazicího boxu byla vytažena kryozkumavka obsahující danou linii buněk HaCaT. Je nutné, aby byla kryozkumavka rozmrazována v dlaních tak dlouho, dokud není pozorován odlesk rozmrazující se suspenze buněk na povrchu. Pipetou o objemu 1 ml bylo odebráno malé množství PBS z centrifugační zkumavky, to bylo přidáno k suspenzi buněk

a okamžitě v kryozkumavce rozsuspendováno. Dále byla část suspenze z kryozkumavky přenesena do centrifugační zkumavky s PBS, znovu bylo odpipetováno malé množství z centrifugační zkumavky, kterým se propláchla kryozkumavka. Tento proces je nutné opakovat, dokud nejsou veškeré buňky převedeny z kryozkumavky do centrifugační zkumavky s PBS. Celý proces musí probíhat co nejrychleji, jelikož je DMSO (používá se jako doplněk v mrazícím médiu, aby se zabránilo tvorbě ledových krystalů, které poškozují buňky) cytotoxický a snižuje míru přežití citlivých buněčných linií. Centrifugační zkumavka byla centrifugována po dobu čtyř minut na 230 RCF, poté byl slit supernatant. Peletka buněk na dně centrifugační zkumavky byla rozsuspendována v 5 ml kultivačního média a přenesena do kultivační lahvičky. Objem v lahvičce je nutné doplnit vždy na potřebný objem médiem (celkový objem ve velké lahvičce musí být 15 ml a v malé lahvičce 5 ml). Celá lahvička byla důkladně zkontrolována pod inverzním mikroskopem a poté uložena do inkubátoru (teplota inkubátoru nastavena na 37 °C s 5 % CO₂).

Pokud byla patrná změna barvy média v kultivační lahvičce (např. oranžová barva) nebo při aktivním růstu buněk byla nutná výměna kultivačního média. Z lahvičky bylo opatrně slito médium a bylo napipetováno čerstvé médium dle velikosti lahvičky (do velké lahvičky 15 ml média, do malé lahvičky 5 ml média).

4.4.3 Pasážování buněk

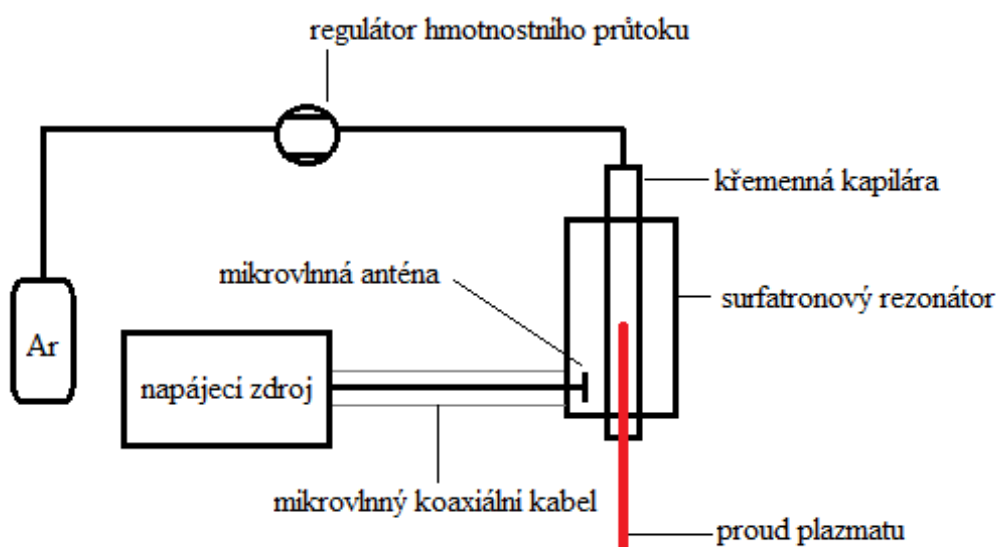
Při kontrole kultivačních lahviček pod mikroskopem je nutné hlídat konfluenci buněk. Většina buněk roste v kultivačních lahvičkách tak dlouho, než dosáhne vysokého procenta konfluence, tj. stavu, kdy buňky zarostou celý povrch dna lahvičky a dostanou se do vzájemného kontaktu, čímž dochází k tzv. kontaktní inhibici. Pokud je konfluence buněk vyšší než 80 %, je nutné provést jejich pasážování.

Dle počtu pasážovaných kultivačních lahviček byly nachystány centrifugační zkumavky s 5 ml PBS (HaCaT). Z kultivačních lahviček bylo slito médium, lahvičky byly čtyřikrát promyty PBS, při posledním promytí byl pufr ponechán v kultivační lahvičce. Poté byl slit pufr a rychle byl do lahvičky napipetován trypsin (do velké lahvičky 1 ml trypsinu, do malé lahvičky 0,5 ml trypsinu). Trypsin byl rozlit po celé lahvičce a lahvička byla inkubována po dobu 10 minut v inkubátoru. Po inkubaci byla lahvička zkontrolována pod mikroskopem, zda došlo k oddělení buněk ode dna lahvičky (byly pozorovány kulaté plovoucí buňky). Pokud nedojde k uvolnění buněk je nutné do lahvičky opatrně klepat, pokud se přesto neoddělí, použije se škrabka. Do lahviček s uvolněnými buňkami byl napipetován PBS z centrifugačních zkumavek a lahvička jim byla pořádně propláchnuta. Poté byl celý obsah lahvičky přenesen zpět do centrifugační zkumavky a zcentrifugován (5 minut při 340 RCF). Byl slit supernatant a peletka buněk byla rozsuspendována v 5 ml média a přenesena do kultivačních lahviček. Objem v lahvičkách byl doplněn médiem dle jejich velikosti (ve velké lahvičce 15 ml, v malé lahvičce 5 ml média). Kultivační lahvička byla důkladně zkontrolována pod mikroskopem a uložena do inkubátoru.

4.5 Plazma a aparatura

4.5.1 Mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou (zdroj č. 1)

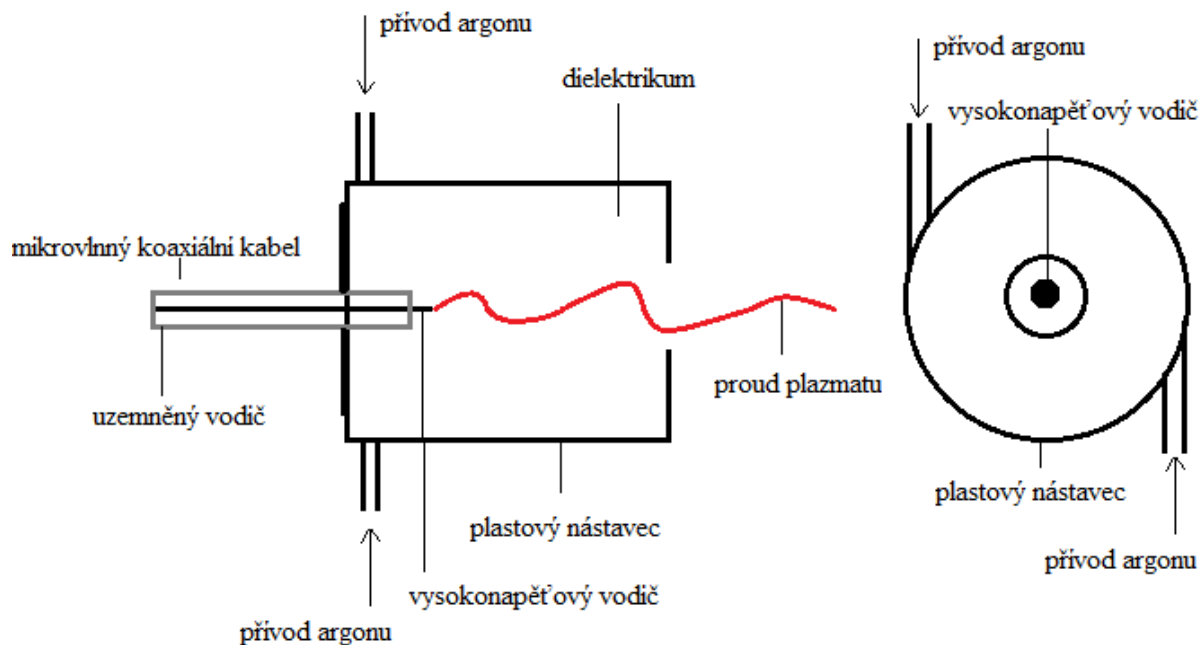
Experimentální zařízení (viz Obrázek 5) bylo tvořeno napájecím zdrojem (budící frekvence 2,45 GHz), na který byl pomocí flexibilního koaxiálního kabelu napojen surfatronový rezonátor. Výkon generátoru byl během jednotlivých měření nastaven dle našich potřeb. V průběhu měření byl rezonátor chlazen průtokem vody 5 l/min o teplotě 20 °C. V kapiláře z křemenného skla s vnějším průměrem 8 mm a vnitřním průměrem 3 mm byl generován výboj. Kapilárou proudil jako pracovní plyn argon s čistotou 99,996 %, skladovaný v tlakové nádobě s redukčním ventilem. Konstantní průtok pracovního plynu během celého měření byl zabezpečen pomocí regulátoru hmotnostního průtoku. Celá aparatura byla při oplazmování na stojanu, aby vzdálenost výboje od oplazmovaného objektu byla laditelná.



Obrázek 5: Schéma aparatury zdroje č. 1

4.5.2 Pochodňový mikrovlnný výboj (zdroj č. 2)

Při oplazmování byl jako zdroj č. 2 použit mikrovlnný pochodňový výboj. Aparaturu můžeme vidět na následujícím schématu (viz Obrázek 6). Mikrovlnný pochodňový výboj byl tvořen mikrovlnným koaxiálním kabelem, kterým byl přiváděn výkon z napájecího zdroje s budící frekvencí 2,45 GHz. Jako pracovní plyn byl použit argon s čistotou 99,996 %, skladovaný v tlakové nádobě s redukčním ventilem. Průtok pracovního plynu během celého měření byl zabezpečen pomocí regulátoru hmotnostního průtoku. Při dostatečném průtoku argonu se na konci vysokonapětového vodiče zapálí pochodňový výboj a vytvoří se plazmový kanál. Pokud není výboj stabilizován proudem plynu, vlní se v prostoru podobně jako plamen pochodně, z čehož je odvozen název tohoto výboje. Takto vytvořený výboj hoří i do kapaliny, což je výhodou v biomedicínských aplikacích jako v případě našeho experimentu (oplazmování buněk v přítomnosti média).



Obrázek 6: Schéma aparatury zdroje č.2 a napravo pohled v řezu

4.6 Scratch test č. 1 a oplazmování

První část postup při scratch testu byla shodná jako při pasážování (viz 4.4.3) až do kroku kdy byly buňky zcentrifugovány, byl slit supernatant a peletka buněk byla rozsuspendována v médiu. Poté byla stanovena koncentrace buněk pomocí počítání buněk v Bürkerově komůrce a následně byla kultura naředěna médiem tak, aby bylo v každé jamce přibližně 180 000 buněk. Test byl prováděn ve 12jamkových kultivačních destičkách. Vhodně naředěná buněčná kultura byla napipetována do kultivačních destiček a do každé jamky byl napipetován 1 ml kultury. Kultivační destičky byly následně umístěny na dobu 24 hodin do inkubátoru. Po 24 hodinách byly destičky vytaženy z inkubátoru a bylo slito médium. Poté byla sterilně v laminárním boxu v každé jamce pomocí špičky pro pipetu (objem 1 ml) vytvořena tzv. umělá rána (kolmo k destičce skrz celý průměr jamky, aby došlo k odstranění monovrstvy buněk v místě rány). Stejným postupem byla takéž připravena destička, která nebyla oplazmována a sloužila jako kontrola.

Oplazmování bylo provedeno v polovičním množství média (0,5 ml), podle diplomové práce Anny Doubravové, kdy zjistila, že v polovičním množství média dochází k ideálnímu oplazmování, tudíž nedochází k vysušení buněk při kontaktu s plazmatem. Oplazmování probíhalo za pomoci dvou zdrojů plazmatu (zdroj č. 1 a zdroj č. 2) vždy ve dvojím opakování. Každé oplazmování mělo své nastavené parametry, jako je výkon zdroje, doba oplazmování a doba pauzy, pokud docházelo k oplazmování ve dvou intervalech dle tabulky (viz Tabulka 2). Po oplazmování, tedy v čase 0 h, byla umělá rána pozorována pod mikroskopem a vyfotografována, poté byly destičky s buňkami uloženy do inkubátoru a pozorovány a vyfotografovány po 24 h od oplazmování. Totéž bylo provedeno i po 48 h od oplazmování.

V následující tabulce (viz Tabulka 2) jsou uvedeny parametry oplazmování keratinocytů pro scratch test č. 1.

Tabulka 2: Scratch test č. 1 a nastavené parametry pro oplazmování

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	dobu (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opracováním (s)	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)
1	1	9	10	8	–	6
2	1	9	20	8	–	6
3	1	9	30	8	–	6
4	1	9	2×10	8	10	6
5	1	9	2×30	8	30	6
6	1	11	10	8	–	3
7	1	11	20	8	–	3
8	1	11	30	8	–	3
9	1	11	2×10	8	10	3
10	2	9	10	8	–	6
11	2	9	20	8	–	6
12	2	9	30	8	–	6
13	2	9	2×10	8	10	6
14	2	9	2×30	8	30	6
15	2	11	10	8	–	3
16	2	11	20	8	–	3
17	2	11	30	8	–	3
18	2	11	2×10	8	10	3

4.7 Scratch test č. 2 a oplazmování

První část postupu při scratchtestu byla shodná jako při pasážování (viz 4.4.3) až do kroku, kdy byly buňky zcentrifugovány, byl slit supernatant a peletka buněk byla rozsuspendována v médiu. Poté byla stanovena koncentrace buněk pomocí počítání buněk v Bürkerově komůrce a následně byla kultura naředěna médiem tak, aby bylo v každé jamce přibližně 180 000 buněk. Test byl prováděn ve 12jamkových kultivačních destičkách. Vhodně naředěná buněčná kultura byla napipetována do kultivačních destiček, tak že do každé jamky byl napipetován 1 ml kultury. Kultivační destičky byly následně umístěny na dobu 24 hodin v inkubátoru. Po 24 hodinách byly destičky vytaženy z inkubátoru a bylo slito médium. Poté byla sterilně v laminárním boxu v každé jamce pomocí špičky pro pipetu (objem 1 ml) vytvořena tzv. umělá rána (kolmo k destičce skrz celý průměr jamky, aby došlo k odstranění monovrstvy buněk v místě rány). Stejným postupem byly taktéž připraveny destičky, které nebyly oplazmovány a sloužily jako kontrola.

Oplazmování bylo provedeno v polovičním množství média (0,5 ml), podle diplomové práce Anny Doubravové, kdy zjistila, že v polovičním množství média dochází k ideálnímu oplazmování, tudíž nedochází k vysušení buněk při kontaktu s plazmatem. Oplazmování probíhalo za pomoci zdroje č. 2 (viz kapitola 4.5.2) vždy ve dvojím opakování. Druhá sada vzorků byla oplazmována dvakrát (druhé oplazmování 24 hodin od prvního). Každé oplazmování mělo své nastavené parametry, jako je výkon zdroje, doba oplazmování a doba pauzy, pokud docházelo k oplazmování ve dvou intervalech dle tabulky (viz Tabulka 3). Po oplazmování, tedy v čase 0 h, byla umělá rána pozorována pod mikroskopem a vyfotografována, poté byly destičky s buňkami uloženy do inkubátoru, pozorovány a vyfotografovány po 24 h od oplazmování. Totéž bylo provedeno i po 48 h od oplazmování. V následující tabulce (viz Tabulka 3) jsou uvedeny parametry oplazmování keratinocytů pro scratch test č. 2.

Tabulka 3: Scratch test č.2 a nastavené parametry pro oplazmování

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	doba (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opracováním (h)	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)
1	2	8	10	3	–	6
2	2	8	20	3	–	6
3	2	8	30	3	–	6
4	2	11	10	3	–	3
5	2	11	20	3	–	3
6	2	11	30	3	–	3
7	2	8	10	4	–	6
8	2	8	20	4	–	6
9	2	8	30	4	–	6
10	2	11	10	4	–	3
11	2	11	20	4	–	3
12	2	11	30	4	–	3
13	2	11	10	5	–	3
14	2	11	20	5	–	3
15	2	11	30	5	–	3
16	2	8	2×10	3	24	6
17	2	8	2×20	3	24	6
18	2	8	2×30	3	24	6
19	2	11	2×10	3	24	3
20	2	11	2×20	3	24	3
21	2	11	2×30	3	24	3
22	2	8	2×10	4	24	6
23	2	8	2×20	4	24	6
24	2	8	2×30	4	24	6
25	2	11	2×10	4	24	3
26	2	11	2×20	4	24	3
27	2	11	2×30	4	24	3
28	2	11	2×10	5	24	3
29	2	11	2×20	5	24	3
30	2	11	2×30	5	24	3

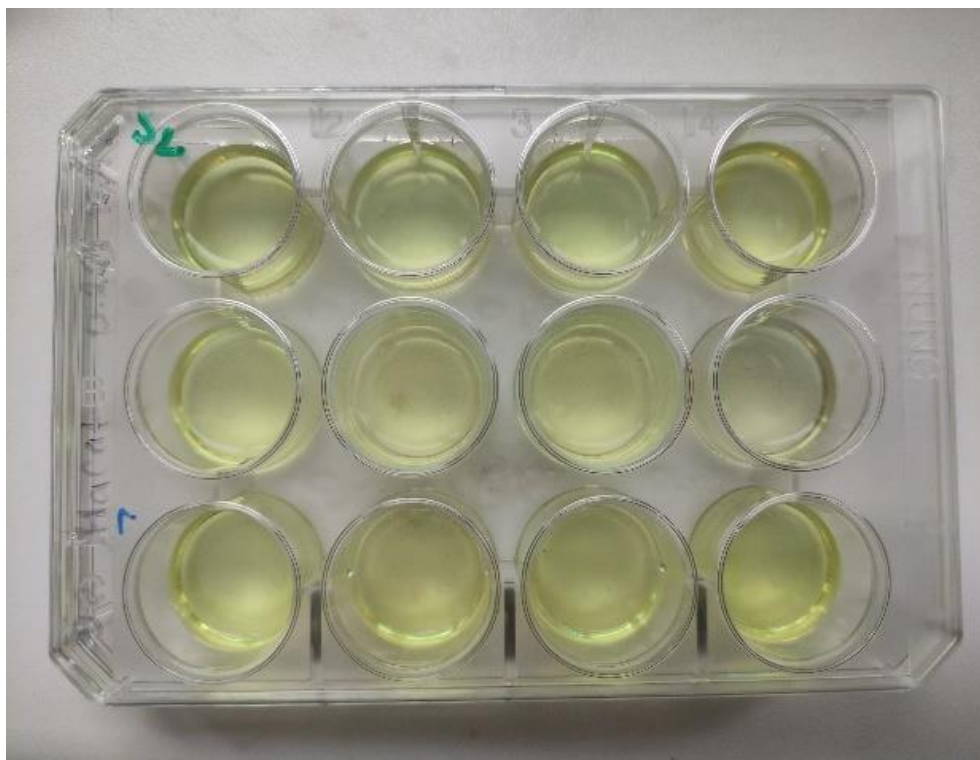
4.8 MTT test a oplazmování

První část postupu při MTT testu byla shodná jako při pasážování (viz 4.4.3) až do kroku kdy byly buňky zcentrifugovány. Dále byl slit supernatant a peletka buněk byla rozsuspendována v médiu. Poté byla stanovena buněčná koncentrace pomocí počítání v Bürkerově komůrce tak, aby byla koncentrace 18 000 buněk na 100 μ l. Test byl prováděn ve 12jamkových kultivačních destičkách. Vhodně naředěná buněčná kultura byla napipetována do kultivačních destiček, tak že do každé jamky byl napipetován 1 ml naředěné kultury. Kultivační destičky byly následně umístěny na dobu 24 hodin do inkubátoru. Po kultivaci byla zkontrolována konfluence buněk v destičkách pod mikroskopem. V každé destičce byl před oplazmováním upraven objem média dle tabulky (viz Tabulka 4).

Opracování probíhalo ve dvou opakováních dle parametrů uvedených v následujících tabulkách (viz Tabulka 4, Tabulka 5). Pro každou sérii byla provedena tzv. cell control, která nebyla oplazmována a sloužila jako kontrola. Opracování probíhalo nesterilně. Po opracování bylo původní médium odpipetováno a do všech jamek byly napipetovány 2 ml nového kultivačního média. Destičky byly uloženy na 24 hodin do inkubátoru při 5 % CO₂ a 37 °C. Poté byl proveden MTT test.

Po 24 hodinách bylo odpipetováno médium ze všech jamek. Do každé jamky bylo napipetováno 400 μ l MTT/PBS o koncentraci 2,5 mg/ml. Destičky byly inkubovány 3 hodiny při 37 °C a poté byly do jamek přidány 2 ml 10% roztoku SDS/PBS. Destičky byly zabaleny do aluminiové folie a uloženy do tmy na 48 h.

Po 48 hodinách byly destičky (pro ukázkou viz Obrázek 7, Obrázek 8) změřeny pomocí čtečky mikrotitračních destiček při vlnové délce 540 nm. Viabilita buněk vystavených plazmatu byla porovnána s viabilitou buněk neopracovaných plazmatem (cell control).



Obrázek 7: Kultivační destička před změřením absorbance (oplazmování bez média)



Obrázek 8: Kultivační destička před změřením absorbance (oplazmování s médiem)

Tabulka 4: Parametry oplazmování pro MMT test – nízký průtok pracovního plynu

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	dobu opracování (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opracováním (s)	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)	objem média (ml)
1	2	9	10	3	–	6	bez
2	2	9	20	3	–	6	bez
3	2	9	30	3	–	6	bez
4	2	9	2×10	3	10	6	bez
5	2	9	2×30	3	30	6	bez
6	2	11	10	3	–	3	bez
7	2	11	20	3	–	3	bez
8	2	11	30	3	–	3	bez
9	2	11	2×10	3	10	3	bez
10	1	9	10	3	–	6	bez
11	1	9	20	3	–	6	bez
12	1	9	30	3	–	6	bez
13	1	9	2×10	3	10	6	bez
14	1	9	2×30	3	30	6	bez
15	1	11	10	3	–	3	bez
16	1	11	20	3	–	3	bez
17	1	11	30	3	–	3	bez
18	1	11	2×10	3	10	3	bez
19	1	9	10	3	–	6	0,5
20	1	9	20	3	–	6	0,5
21	1	9	30	3	–	6	0,5
22	1	9	2×10	3	10	6	0,5
23	1	9	2×30	3	30	6	0,5
24	1	11	10	3	–	3	0,5
25	1	11	20	3	–	3	0,5
26	1	11	30	3	–	3	0,5
27	1	11	2×10	3	10	3	0,5
28	2	9	10	3	–	6	0,5
29	2	9	20	3	–	6	0,5
30	2	9	30	3	–	6	0,5
31	2	9	2×10	3	10	6	0,5
32	2	9	2×30	3	30	6	0,5
33	2	11	10	3	–	3	0,5
34	2	11	20	3	–	3	0,5
35	2	11	30	3	–	3	0,5
36	2	11	2×10	3	10	3	0,5

Tabulka 5: Parametry oplazmování pro MMT test – vyšší průtok pracovního plynu

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	dobu opracování (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opracováním (s)	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)	objem média (ml)
37	2	9	10	4	–	6	0,5
38	2	9	20	4	–	6	0,5
39	2	9	30	4	–	6	0,5
40	2	9	2×10	4	10	6	0,5
41	2	9	2×30	4	30	6	0,5
42	2	11	10	4	–	3	0,5
43	2	11	20	4	–	3	0,5
44	2	11	30	4	–	3	0,5
45	2	11	2×10	4	10	3	0,5
46	2	11	2×30	4	30	3	0,5
47	2	11	10	5	–	3	0,5
48	2	11	20	5	–	3	0,5
49	2	11	30	5	–	3	0,5
50	2	11	2×10	5	10	3	0,5
51	2	11	2×30	5	30	3	0,5

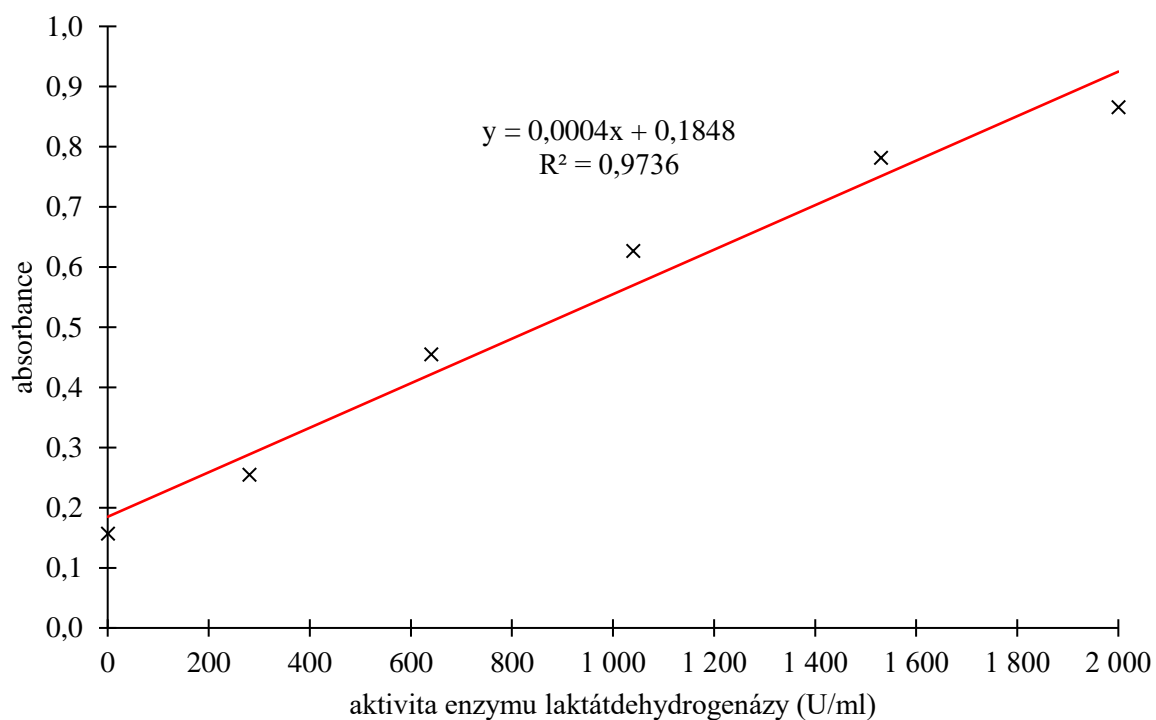
4.9 LDH test

Laktátdehydrogenáza je enzym nacházející se v cytoplazmě buněk mnoha tkání. Z buněk se uvolňuje již při jejich mírném poškození. Pro stanovení cytotoxicity s využitím LDH testu byly využity supernatanty z předchozího MTT testování, které byly zamrazeny. Tento test probíhal na 96místných mikrotitračních destičkách.

K 10 μ l buněčných supernatantů bylo přidáno 50 μ l roztoku NADH v pyruvátu (roztok vznikl rozpuštěním NADH do 0,75 mM roztoku pyruvátu sodného na koncentraci NADH 1 mg/ml). Následovalo 30 minut inkubace při teplotě 37 °C. Poté bylo do jamek přidáno 50 μ l roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu (20 mg 2,4-dinitrofenylhydrazinu rozpuštěno ve 100 ml 1 M HCl). Destičky byly ponechána ve tmě po dobu 20 minut. Nakonec bylo do jamek napipetováno 50 μ l 4 M roztoku NaOH a po 5 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Aktivita enzymu laktátdehydrogenázy byla vypočtena z kalibrační křivky vytvořené ze standardního roztoku pyruvátu sodného v NADH v koncentracích odpovídajících absolutní aktivitě 0 až 2000 U/ml dle následující tabulky (viz Tabulka 6), kdy bylo místo 10 μ l supernatantu a 50 μ l roztoku NADH v pyruvátu pipetováno 60 μ l těchto koncentračních roztoků:

Tabulka 6: Příprava roztoků pro sestavení kalibrační přímky

bod kalibrační řady	směs pyruvát/NADH(μl)	voda (μl)	aktivita LDH (U/ml)
1.	500	50	0
2.	400	150	280
3.	300	250	640
4.	200	350	1040
5.	100	450	1530
6.	50	500	2000



Obrázek 9: Kalibrační přímka (závislost absorbance na aktivitě laktátdehydrogenázy)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

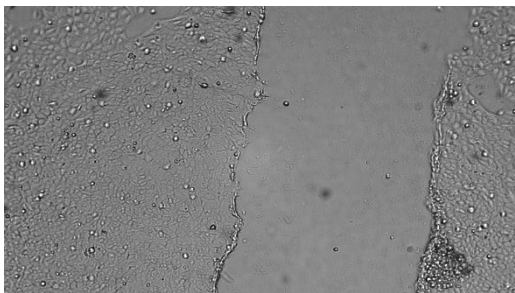
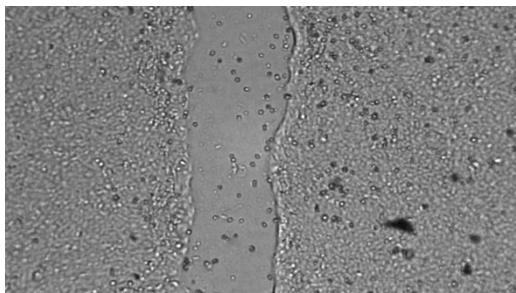
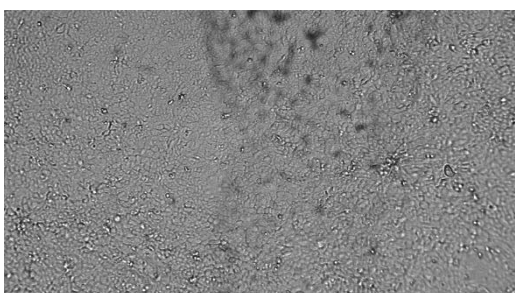
Tato práce byla zaměřena na možnosti využití nízkoteplotního plazmatu pro urychlení procesu hojení ran. V experimentální části byl nejprve s využitím dvou různých zdrojů nízkoteplotního plazmatu proveden *in vitro* test hojení ran. Tento test hojení ran (scratch test) byl proveden na monovrstvě keratinocytů linie HaCaT. Testování bylo uskutečněno za použití různých parametrů. Sledován byl především vliv doby ošetření plazmatem, dále také vliv použitého výkonu plazmového výboje a vliv průtoku pracovního plynu argonu. Dále byla s využitím MTT a LDH testu cytotoxicity sledována také viabilita kožních buněk po jejich oplazmování při použití stejných podmínek jako u *in vitro* testu hojení ran.

5.1 Výsledky scratch testu č. 1

Principem scratch testu, tedy *in vitro* testu hojení ran, je sledování rychlosti zacelení uměle vytvořené rány do monovrstvy kožních buněk. Přesný postup včetně použitých parametrů, nastavení plazmové trysky i doby ošetření jsou uvedeny v kapitole 4.6.

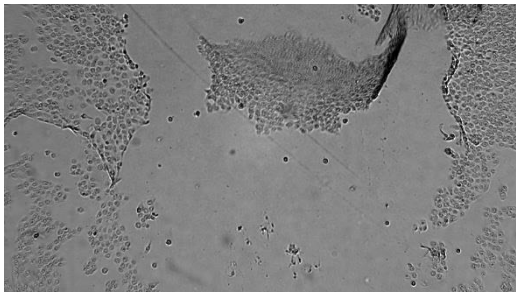
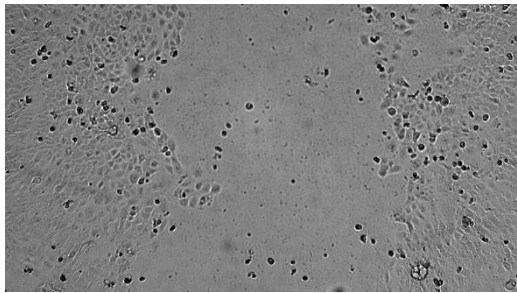
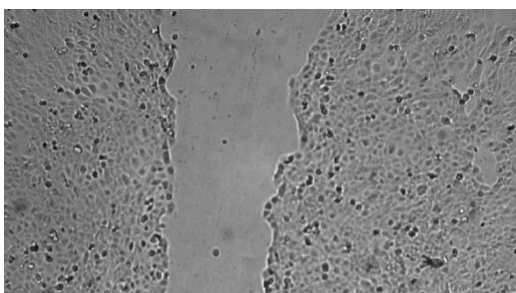
Níže jsou v tabulkách zobrazeny vybrané snímky z mikroskopu, znázorňující průběh *in vitro* testu hojení ran. První fotografie v tabulce byla pořízena vždy v čase 0 hodin od oplazmování, druhá po 24 hodinách od oplazmování a třetí po 48 hodinách od oplazmování. Pro ilustraci uvádím tři případy zacelení a to: první případ hojení rány bez ovlivnění plazmatem (kontrola), druhý případ nedokonalého zacelování vytvořené rány a třetí případ kdy došlo k úplnému zacelení umělé rány a kdy hojení rány probíhalo rychleji ve srovnání s kontrolou. Kompletní sada snímků z celého scratch testu č. 1 je uvedena v příloze (9.1).

Tabulka 7: Scratch test č. 1, kontrolní test (0 h, 24 h, 48 h), bez oplazmování, zvětšení 100×

0 h		24 h	
48 h		<div>0 h</div> <ul style="list-style-type: none">• zacelení 0 % <div>24 h</div> <ul style="list-style-type: none">• zacelení 61 % <div>48 h</div> <ul style="list-style-type: none">• zacelení 100 %	

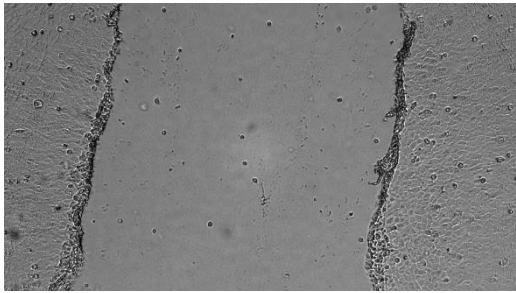
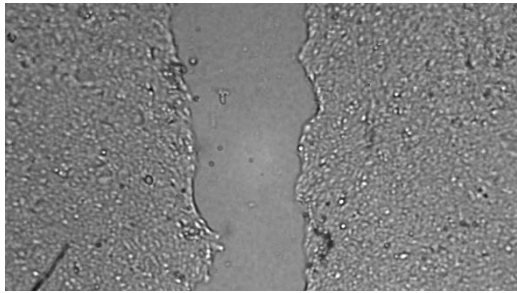

Na snímcích výše (viz Tabulka 7) vidíme kontrolní test, kdy uměle vytvořená rána nebyla oplazmována, nepodléhala tedy vlivu plazmatu. Na prvním snímku (0 hodin) vidíme, velikost uměle vytvořené rány. Po 24 hodinách byla rána zacelena již z 61 %. Migrace buněk směrem dovnitř rány a zacelení probíhalo rovnoměrně. Po 48 hodinách byla již rána ze 100 % zacelena. Přičemž ze snímku lze přibližně určit místo, kde se uměle vytvořená rána nacházela.

Tabulka 8: Scratch test č. 1, měření č. 2 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 9 W, doba opracování 20 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		0 h • zacelení 0 % 24 h • zacelení 37,5 % 48 h • zacelení 62,5 %	

Na snímcích v tabulce (viz Tabulka 8) vidíme výsledky z měření č. 2, kdy byl použit nižší výkon 9 W a doba opracování byla 20 sekund. Na prvním snímku (0 hodin) vidíme vytvořenou ránu. Po 24 hodinách byla rána zacelena bohužel jen ze 37,5 %. V čase 48 hodin byla rána zacelena ze 62,5 %, což je oproti kontrole nedostačující. Pomalejší zacelení rány mohlo být způsobeno například snížením viability buněk po jejich částečném vysušení vlivem nosného plynu při jejich ošetření plazmatem, toto nastavení tedy není pro urychlení procesu hojení ran vhodné.

Tabulka 9: Scratch test č. 1, měření č. 10 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 9 W, doba opracování 10 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 66 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

Na snímcích výše (viz Tabulka 9) vidíme výsledky z měření č. 10, kdy byl pro urychlení hojení rány použit zdroj plazmatu č.2 (mikrovlnný pochodňový výboj), nižší výkon 9 W a doba opracování byla 10 sekund. Na prvním snímku (0 hodin) vidíme uměle vytvořenou ránu. Po 24 hodinách se rána zacelila již z 66 %, což je o 5 % rychleji než u kontrolního testu. Lze zde pozorovat skvělou migraci a proliferaci keratinocytů. Po 48 hodinách je rána ze 100 % zacelena. Ze snímku lze pak, stejně jako u kontroly, určit místo, kde se uměle vytvořená rána původně nacházela. Díky rychlejšímu zacelení rány, ve srovnání s kontrolou, je tak použití mikrovlnného pochodňového výboje při kratší době působení možné využít pro urychlení procesu hojení ran.

Tabulka 10: Shrnutí výsledků měření scratch testu č. 1

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	dobu (s)	pauza mezi opracováním (s)	zacelení 24 h (%)	zacelení 48 h (%)
kontrola	–	–	–	–	61	100
1	1	9	10	–	70	80
2	1	9	20	–	38	63
3	1	9	30	–	10	50
4	1	9	2×10	10	40	60
5	1	9	2×30	30	38	39
6	1	11	10	–	29	72
7	1	11	20	–	22	38
8	1	11	30	–	13	100
9	1	11	2×10	10	8	100
10	2	9	10	–	66	100
11	2	9	20	–	43	100
12	2	9	30	–	85	100
13	2	9	2×10	10	46	100
14	2	9	2×30	30	70	100
15	2	11	10	–	60	92
16	2	11	20	–	75	100
17	2	11	30	–	77	100
18	2	11	2×10	10	40	100

Pro přehlednost uvádím v tabulce (viz Tabulka 10) i kompletní výsledky z jednotlivých měření *in vitro* testu hojení ran (scratch testu č. 1). Zdroj č. 1, tedy mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, významně neurychlil ve srovnání s kontrolou proces hojení ran při žádném z použitých nastavení. Umělá rána, až na ošetření při vyšším výkonu (11 W) a delší době opracování (30 sekund a 2×10 sekund), nebyla při použití tohoto zdroje po uplynutí 48 hodin zcela zacelena. Použitý mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou zřejmě vysušuje proudem nosného plynu ošetřované buňky, dochází tak ke snížení jejich viability a rychlost zacelení rány je tak ve srovnání s kontrolou nižší.

Naproti tomu pochodňový mikrovlnný výboj (zdroj č. 2) obstál při zacelení umělé rány ve většině použitých nastaveních. Rychlejší hojení rány oproti kontrole, probíhalo při měření č. 10, 12 a 14 tedy za využití nižšího výkonu 9 W a doby ošetření 10, 30 sekund a 2×30 sekund. Dále bylo zrychlení hojení rány pozorováno také při použití vyššího výkonu 11 W při měření č. 16 a 17 (doba ošetření 20 a 30 sekund). Zdroj č. 2 se tedy v těchto případech dle výsledků z *in vitro* testu hojení ran jeví jako potenciálně vhodný pro rychlejší hojení ran.

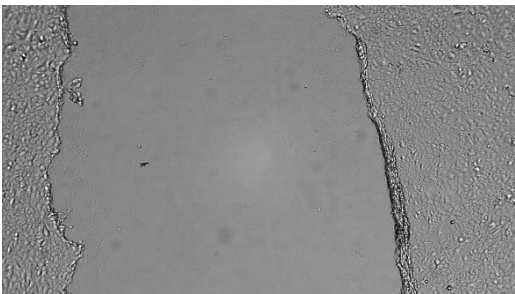
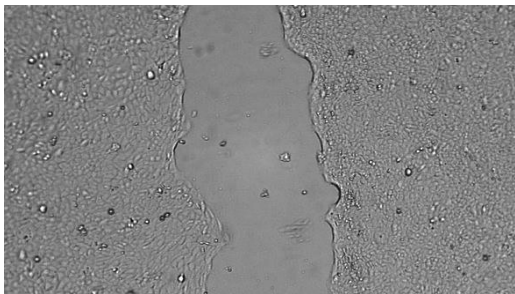
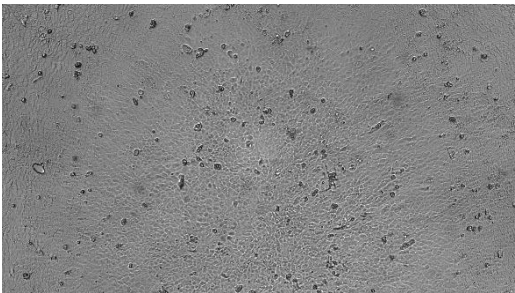
5.2 Výsledky scratch testu č. 2

V následujícím testu hojení ran, scratch testu č. 2, byl ve dvou sériích testován již pouze zdroj č. 2 (viz Pochodňový mikrovlnný výboj (zdroj č. 2), který byl dle dosažených výsledků v předchozím testu vyhodnocen jako vhodnější. Při testování byly v obou sériích použity stejné parametry nastavení. První série byla ale ošetřena pouze jednou, naopak druhá série měření byla ošetřena opakovaně (přesněji dvakrát) a to v čase 0 hodin a 24 hodin (dle parametrů viz. Scratch test č. 2 a oplazmování).

Níže jsou pro ilustraci přehledně v tabulkách snímky z mikroskopu, znázorňující průběh provedeného scratch testu, tedy zacelení uměle vytvořené rány po oplazmování. První fotografie byla pořízena vždy v čase 0 hodin od oplazmování, druhá po 24 hodinách od prvního oplazmování a třetí po 48 hodinách od prvního oplazmování. Pro ilustraci uvádím tři případy zacelení a to: první případ zacelení bez ovlivnění plazmatem (kontrola), druhý případ nedokonalého zacelování a třetí případ zacelení, kdy uzavření rány probíhalo rychleji oproti kontrole.

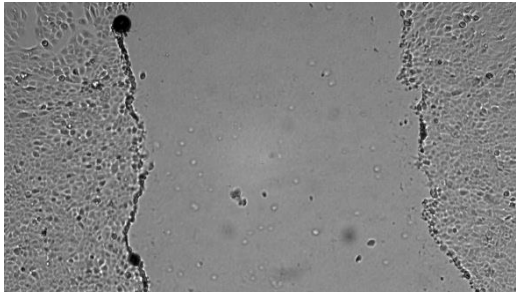
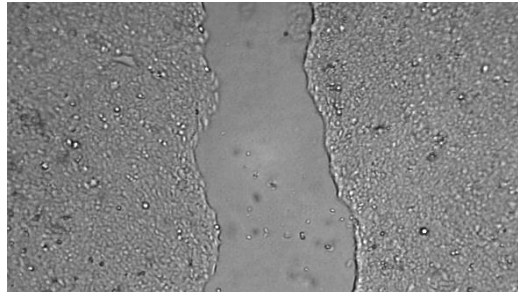
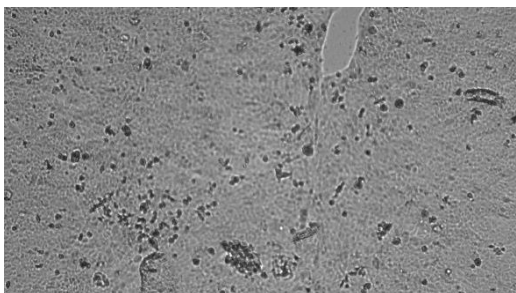
Ostatní snímky celého scratch testu č. 2 jsou uvedeny v příloze. (viz Detailní snímky průběhu scratch testu č. 2)

Tabulka 11: Scratch test č. 2, kontrola (0 h, 24 h, 48 h), bez oplazmování, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 57 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

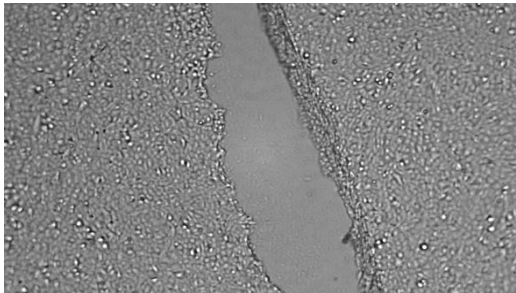
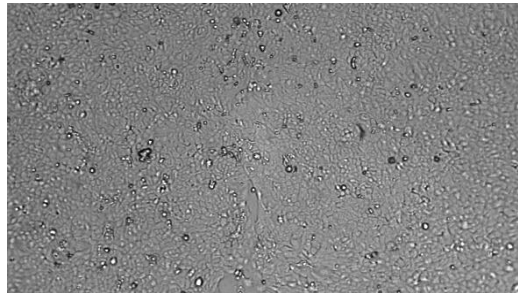
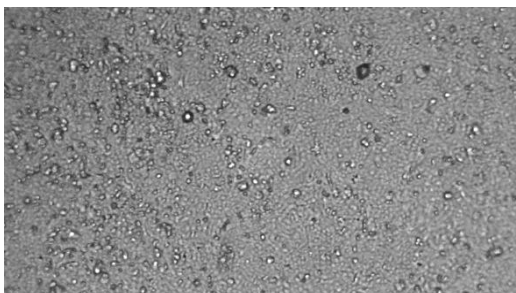
Na snímku výše (viz Tabulka 11) vidíme kontrolní test, kdy uměle vytvořená rána nebyla oplazmována, nepodléhala tedy vlivu plazmatu. Na prvním snímku (0 hodin) vidíme, že se uvnitř rány nenacházely téměř žádné buňky. Po 24 hodinách byla rána zacelena již z 57 %, což oproti předchozímu scratch testu č. 1, kdy dosahovala rána kontroly po 24 hodinách zacelení 61 %, není velký rozdíl. Migrace buněk směrem dovnitř rány a zacelení probíhalo přibližně rovnoměrně. Po 48 hodinách byla již rána ze 100 % zacelena.

Tabulka 12: Scratch test č. 2, měření č. 6 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 10 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 56 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 94 % 	

Na snímků výše (viz Tabulka 12) vidíme snímky z měření č. 6, kdy byl použit vyšší výkon 11 W a doba opracování byla 10 sekund. Na prvním snímku (0 hodin) vidíme otevřenou ránu. Po 24 hodinách byla ranka zacelená z 56 %, což je oproti kontrole nižší hodnota zacelení, lišící se ale pouze o 1 %. V čase 48 hodin byla rána zacelená z 94 %, což je oproti kontrole pomalejší zacelení.

Tabulka 13: Scratch test č. 2, měření č. 7 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 20 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 85 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

Výše (viz Tabulka 13) vidíme snímky z měření č. 7, kdy byl použit také zdroj plazmatu č. 2, vyšší výkon 11 W a doba opracování byla 20 sekund. Na prvním snímku (0 hodin) vidíme čistou otevřenou ranku bez buněk uvnitř ranky. Po 24 hodinách se rána zacelila již z 85 % (zbývala zde jen nepatrná skulinka rány a v některých místech již byla rána zcela zacelena), což je o 28 % rychleji než u kontrolního testu. Lze zde pozorovat skvělou migraci a proliferaci keratinocytů. Po 48 hodinách je rána ze 100 % zacelena. Takovýto výsledek testu hojení ran byl požadován a dané nastavení tedy vyhovuje možným aplikacím nízkoteplotního plazmatu pro zrychlení procesu hojení ran. Dále je zde uvedená tabulka se souhrnem výsledků scratch testu č. 2 (viz Tabulka 14), kde vidíme, že se rána kompletně nezacelila pouze v případě měření č. 6 (vyšší nastavený výkon 11 W, doba opracování 10 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 23 (nižší nastavený výkon 8 W, doba opracování 2×20 sekund s pauzou 24 hodin, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 27 (vyšší nastavený výkon 11 W, doba opracování 2×30 sekund s pauzou 24 hodin, průtok pracovního plynu 4 l/min), a oproti kontrole byly při zacelení pomalejší měření č. 9 (vyšší nastavený výkon 11 W, doba opracování 2×10 sekund s pauzou 10 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 20 (vyšší nastavený výkon 11 W, doba opracování 2×20 sekund s pauzou 24 hodin, průtok pracovního plynu 3 l/min), kde ale došlo k úplnému zacelení uměle vytvořené rány.

Tabulka 14: Souhrn výsledků scratch testu č. 2

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	doba (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opravováním	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)	zacelení 24 hodin (%)	zacelení 48 hodin (%)
kontrola	–	–	–	–	–	–	57	100
1	2	8	10	4	–	6	84	100
2	2	8	20	4	–	6	70	100
3	2	8	30	4	–	6	89	100
4	2	8	2×10	4	10 s	6	84	100
5	2	8	2×30	4	30 s	6	82	100
6	2	11	10	4	–	3	56	94
7	2	11	20	4	–	3	85	100
8	2	11	30	4	–	3	91	100
9	2	11	2×10	4	10 s	3	43	100
10	2	11	2×30	4	30 s	3	95	100
11	2	11	10	5	–	3	89	100
12	2	11	20	5	–	3	91	100
13	2	11	30	5	–	3	73	100
14	2	11	2×10	5	10 s	3	80	100
15	2	11	2×30	5	30 s	3	86	100
16	2	8	2×10	3	24 h	6	97	100
17	2	8	2×20	3	24 h	6	95	100
18	2	8	2×30	3	24 h	6	68	100
19	2	11	2×10	3	24 h	3	59	100
20	2	11	2×20	3	24 h	3	53	100
21	2	11	2×30	3	24 h	3	80	100
22	2	8	2×10	4	24 h	6	81	100
23	2	8	2×20	4	24 h	6	84	88
24	2	8	2×30	4	24 h	6	70	100
25	2	11	2×10	4	24 h	3	83	100
26	2	11	2×20	4	24 h	3	69	100
27	2	11	2×30	4	24 h	3	66	97
28	2	11	2×10	5	24 h	3	90	100
29	2	11	2×20	5	24 h	3	86	100
30	2	11	2×30	5	24 h	3	72	100

5.3 Výsledky MTT testu

Dále byla s využitím cytotoxického testu MTT sledována také viabilita kožních buněk po jejich oplazmování při použití stejných podmínek jako u výše zmíněného *in vitro* testu hojení ran. Principem tohoto testu bylo sledování viability buněk vystavených působení plazmatu po různou dobu a s různým nastavením ve srovnání s kontrolou. Po přečtení absorbance kultivačních destiček pomocí ELISA readeru (viz kapitola 4.8 MTT test a oplazmování) byly tedy jednotlivé hodnoty absorbancí zprůměrovány a porovnány s hodnotami absorbancí jamek tzv. cell control. Hodnoty absorbancí cell kontrol jamek byly brány jako 100% viabilita buněk, tudíž se hodnoty absorbancí oplazmovaných vzorků buněk, změřené při vlnové délce 540 nm vztahovaly k absorbanci jamek cell control.

V následující tabulce (viz Tabulka 15) vidíme přehled viabilit naměřených pomocí MTT testu po ošetření plazmatem bez přítomnosti média. Všechny hodnoty viabilit, které nedosahují alespoň 50 %, jsou označeny červeně a parametry tak nevyhovují našim potřebám pro zachování viability buněk a zrychlenému hojení ran. Z dosažených výsledků je jasné patrné, že všechna ošetření, která probíhala za nepřítomnosti média, způsobovala dle hodnot viabilit potenciální cytotoxický účinek. Keratinocyty byly zřejmě proudem nosného plynu při ošetření vysušeny. Tento pokus byl proveden především s cílem vystavit buňky přímému kontaktu s výbojem plazmatu. Při *in vitro* kultivaci keratinocytů však buňky bez média rychle ztrácí svoji viabilitu i bez dalších negativních vlivů a tento test je tak tímto jevem výrazně ovlivněn.

Tabulka 15: Výsledky MTT testu – oplazmování bez přítomnosti média

měření č.	zdroj č.	výkon (W)	doba opracování (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opracováním (s)	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)	objem média (ml)	viabilita buněk dle MTT testu (%)
1	2	9	10	3	–	6	bez	29,90± 1,94
2	2	9	20	3	–	6	bez	34,16± 0,13
3	2	9	30	3	–	6	bez	14,20± 0,05
4	2	9	2×10	3	10	6	bez	14,07± 0,21
5	2	9	2×30	3	30	6	bez	13,60± 0,21
6	2	11	10	3	–	3	bez	13,88± 0,74
7	2	11	20	3	–	3	bez	14,16± 0,97
8	2	11	30	3	–	3	bez	19,51± 0,03
9	2	11	2×10	3	10	3	bez	14,07± 0,94
10	1	9	10	3	–	6	bez	13,62± 1,63
11	1	9	20	3	–	6	bez	12,67± 4,63
12	1	9	30	3	–	6	bez	8,86± 0,66
13	1	9	2×10	3	10	6	bez	26,26± 0,10
14	1	9	2×30	3	30	6	bez	14,16± 0,15
15	1	11	10	3	–	3	bez	39,57± 0,38
16	1	11	20	3	–	3	bez	15,19± 1,97
17	1	11	30	3	–	3	bez	14,07± 0,18
18	1	11	2×10	3	10	3	bez	14,35± 0,05

V dalším testu byl proveden již standardní MTT za přítomnosti média. Dosažené výsledky jsou zobrazeny v následující tabulce (viz Tabulka 16). V tabulce vidíme světle zeleně označené hodnoty viabilit, kdy použité parametry při ošetření plazmovým výbojem nepůsobily na buňky cytotoxicky a buňky si tak dostatečně zachovávaly svou biologickou aktivitu. Tmavší zelená znázorňuje v tabulce případy, kdy byla hodnota stanovené viability keratinocytů ve srovnání s cell kontrol vyšší. V těchto případech tak nastavené parametry oplazmování způsobily větší nárůst buněk a jsou tak potenciálně využitelné pro zrychlení hojení ran, tedy pro možnou rychlou regeneraci poškozené kůže, či při léčbě chronických ran.

Dále jsou všechny naměřené hodnoty viabilit uvedeny v grafech v následujících kapitolách, kde jsou data porovnány s viabilitou buněk jamek cell control a podrobněji okomentovány.

Tabulka 16: Výsledky MTT testu – oplazmování za přítomnosti média

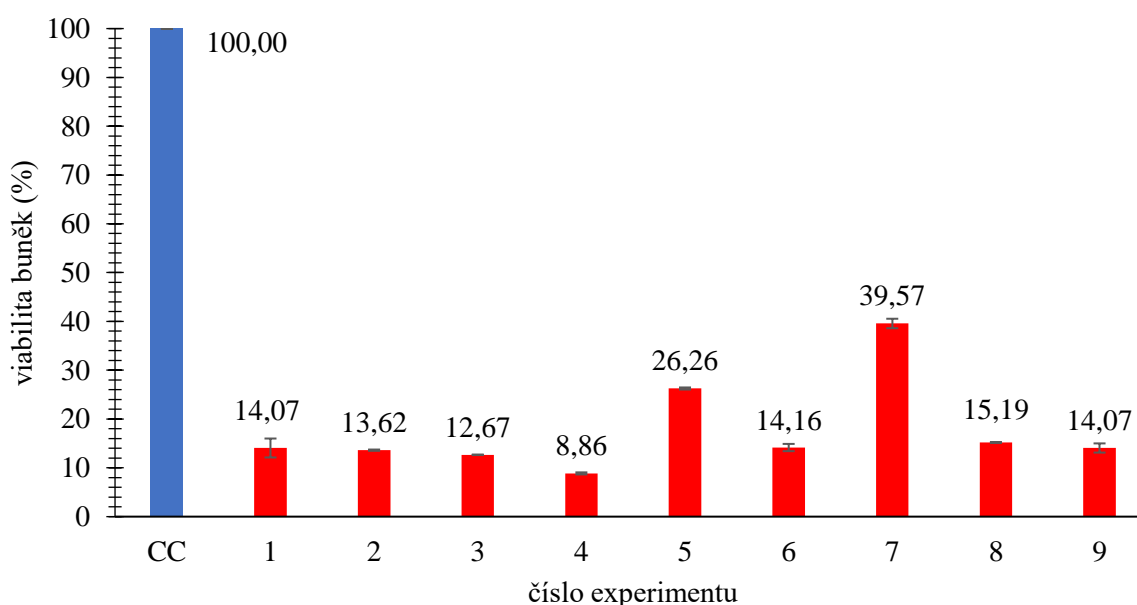
měření č.	zdroj č.	výkon (W)	dobu opracování (s)	průtok prac. plynu (l/min)	pauza mezi opracováním (s)	vzdálenost plazmatu od kultivační destičky (mm)	objem média (ml)	viabilita buněk dle MTT testu (%)
19	1	9	10	3	–	6	0,5	155,39± 8,76
20	1	9	20	3	–	6	0,5	150,61± 0,82
21	1	9	30	3	–	6	0,5	151,27± 17,37
22	1	9	2×10	3	10	6	0,5	80,56± 3,27
23	1	9	2×30	3	30	6	0,5	102,59± 2,83
24	1	11	10	3	–	3	0,5	123,60± 3,38
25	1	11	20	3	–	3	0,5	99,78± 10,92
26	1	11	30	3	–	3	0,5	73,34± 8,26
27	1	11	2×10	3	10	3	0,5	98,66± 6,03
28	2	9	10	3	–	6	0,5	98,93± 2,30
29	2	9	20	3	–	6	0,5	124,84± 6,26
30	2	9	30	3	–	6	0,5	116,38± 0,39
31	2	9	2×10	3	10	6	0,5	111,89± 6,52
32	2	9	2×30	3	30	6	0,5	81,34± 4,28
33	2	11	10	3	–	3	0,5	79,84± 0,65
34	2	11	20	3	–	3	0,5	96,91± 5,61
35	2	11	30	3	–	3	0,5	81,47± 3,12
36	2	11	2×10	3	10	3	0,5	68,51± 3,06
37	2	9	10	4	–	6	0,5	85,90± 1,38
38	2	9	20	4	–	6	0,5	75,93± 7,54
39	2	9	30	4	–	6	0,5	83,26± 5,83
40	2	9	2×10	4	10	6	0,5	79,35± 4,95
41	2	9	2×30	4	30	6	0,5	63,92± 0,10
42	2	11	10	4	–	3	0,5	94,77± 10,75
43	2	11	20	4	–	3	0,5	124,14± 0,14
44	2	11	30	4	–	3	0,5	96,13± 0,57
45	2	11	2×10	4	10	3	0,5	104,23± 4,13
46	2	11	2×30	4	30	3	0,5	90,15± 0,28
47	2	11	10	5	–	3	0,5	83,97± 3,10
48	2	11	20	5	–	3	0,5	81,55± 4,34
49	2	11	30	5	–	3	0,5	114,18± 0,28
50	2	11	2×10	5	10	3	0,5	107,71± 7,69
51	2	11	2×30	5	30	3	0,5	85,89± 8,96

5.3.1 MTT test (oplazmování bez média zdroj č. 2)

Na následujícím grafu (viz Obrázek 10) vidíme viabilitu buněk naměřenou pomocí MTT testu, kdy oplazmování zdrojem č. 2 (pochodňový mikrovlnný výboj) probíhalo bez přítomnosti média.

Z hodnot viabilit, které nejsou větší než hodnota $34,16 \pm 0,13$ % (měření č. 2, nastaven nižší výkon a doba opracování 20 sekund) lze vyčíst, že keratinocytům ošetření vlivem přímého kontaktu plazmového výboje v prostředí bez média neprospívalo. Vlivem nosného plynu docházelo bez přítomnosti média při ošetření k vysušování buněk a tyto nevhodné *in vitro* podmínky přispěly k výraznému snížení viability buněk.

Nejnižší hodnota viability dosahovala $13,60 \pm 0,21$ % a byla stanovena u měření č. 5, kdy byl nastaven nižší výkon, ale oplazmování probíhalo dvakrát po dobu 30 sekund s pauzou 30 sekund mezi oplazmováním. Oplazmování bez média se tedy neukázalo jako vhodná metoda pro sledování vlivu plazmatu na proliferaci buněk. Jelikož je hodnota viability pod 50 %, dají se parametry nastavené v měření č. 1–9 označit za potenciálně cytotoxické. Lze ale předpokládat, že hlavní parametr, který způsobil poškození buněk je jen objem média při jejich oplazmování.



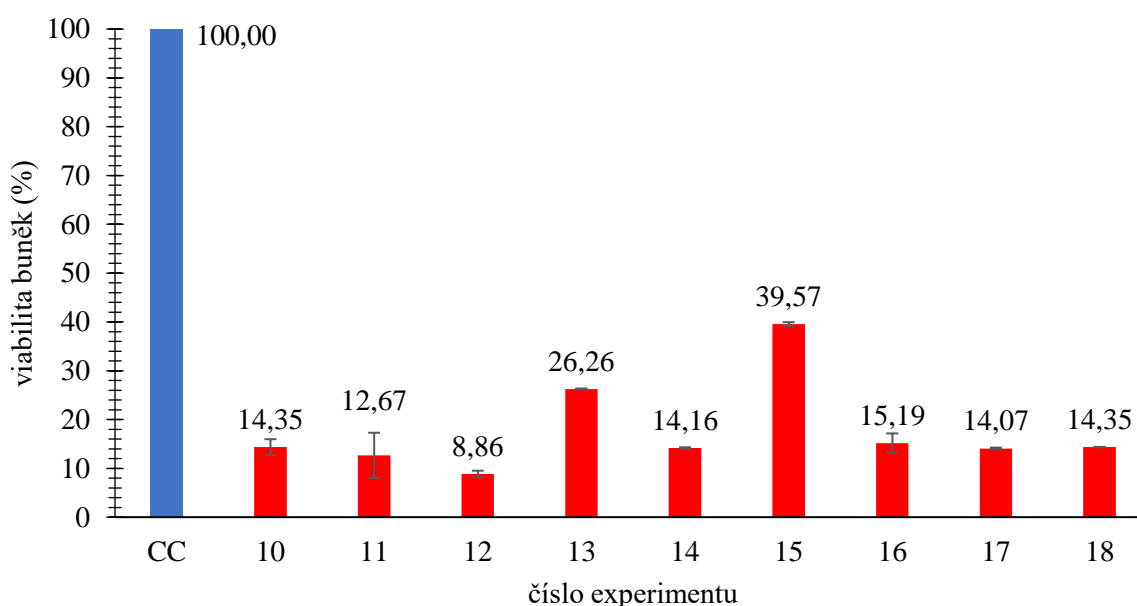
Obrázek 10: MTT test – Viabilita buněk při měření č. 1–9 vztažená ke 100% viabilitě (cell control)

5.3.2 MTT test (oplazmování bez média zdroj č. 1)

Na následujícím grafu (viz Obrázek 11) pozorujeme viabilitu buněk naměřenou pomocí MTT testu, kdy oplazmování zdrojem č. 1 (mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou) probíhalo taktéž bez přítomnosti média.

Z hodnot viabilit, které nejsou větší než 39,57 % u měření č. 15 (vyšší výkon 11 W, pouze 10 sekund ošetření plazmatem a nízký průtok pracovního plynu 3 l/min) lze usuzovat, že buňkám oplazmování bez přítomnosti média neprospívá, jak se již potvrdilo v předchozích

měřeních č. 1 až 9 a docházelo opětovně ke kontaktu nosného plynu a buněk, který zapříčinil jejich vysušení. Oplazmování bez média tedy není vhodné pro testování proliferace buněk nezávisle na zdroji. Jelikož je hodnota viability pod 50 %, dají se parametry nastavené v těchto měřeních č. 10 až 18 označit za potenciálně cytotoxické. Předpokládáme ale, že hlavní parametr ovlivňující hodnoty viability je tedy opět nepřítomnost média při oplazmování. Nejnižší hodnota viability v této sérii $8,86 \pm 0,66$ % byla naměřena u experimentu č. 12, kdy byl nastaven nižší výkon 9 W a oplazmování probíhalo bez opakování po dobu 30 s. Nejvyšší hodnota viability v této sérii $39,57 \pm 0,38$ % byla naměřena u experimentu č. 15 a to u nastaveného vyššího výkonu a ošetření plazmatem po dobu 10 sekund.



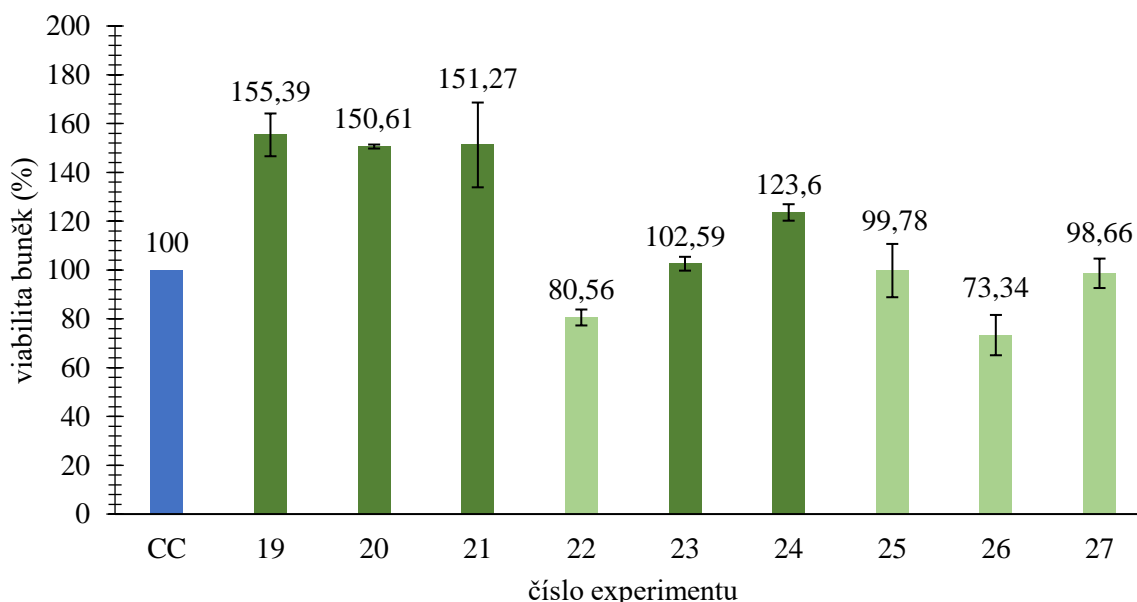
Obrázek 11: MTT test – Viabilita buněk při měření č. 10–18 vztažená ke 100% viabilitě (cell control)

5.3.3 MTT test (oplaszmování s médiem zdroj č. 1, průtok prac. plynu 3 l/min)

Následující graf (viz Obrázek 12) zobrazuje viabilitu buněk naměřenou pomocí MTT testu, kdy oplazmování zdrojem č.1 (mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou) probíhalo již za přítomnosti 0,5 ml média v jamce, při nižším průtoku pracovního plynu (3 l/min).

Z hodnot viabilit u měření č. 19–24 (kromě měření č. 22 – nižší výkon 9 W, doba ošetření 2×10 sekund), které přesáhly hodnotu 100 % (cell control), můžeme u nastavených podmínek předpokládat potenciálně pozitivní vliv na zrychlení procesu hojení ran. Jelikož jsou také všechny stanovené hodnoty viability vyšší než 50 %, lze všechny nastavené parametry při oplazmování považovat za bezpečné pro aplikaci na kožní buňky. Všechny hodnoty viabilit měření č. 19–27 navíc neklesly pod hodnotu 80 % procent, což je oproti měřením při ošetření plazmatem bez média (měření č. 1–18) markantní rozdíl a lze říct, že přítomnost média má hlavní vliv na viabilitu buněk při provádění tohoto testu. Nejvyšší hodnoty viabilit byly zaznamenány u prvních tří měření (č. 19–21), kdy se jednalo o oplazmování s nižším nastaveným výkonem 9 W, doba ošetření 10, 20 a 30 s bez opakování. Nejvyšší hodnota viability byla naměřena u měření č. 19 (nižší výkon 9 W, doba opracování plazmatem

10 sekund a nižší průtok pracovního plynu 3 l/min) a to $155,39 \pm 8,76$ %. Nejnížší hodnota viability této série byla hodnota $73,34 \pm 8,26$ % u měření č. 26 (vyšší nastavený výkon 11 W, oplazmování bez opakování po dobu 30 s, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min).



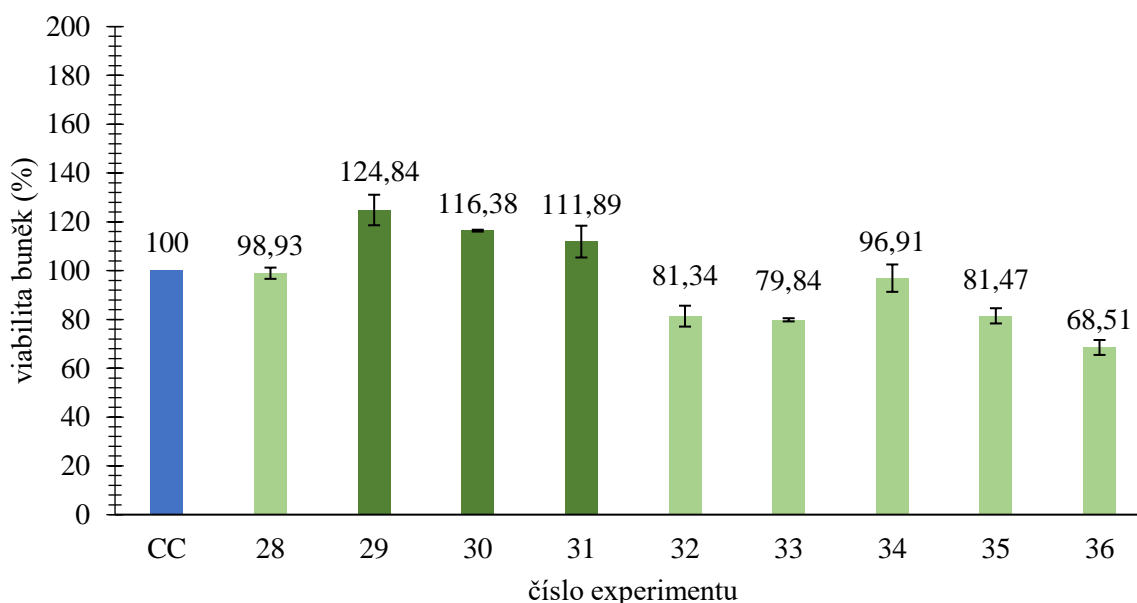
Obrázek 12: MTT test – Viabilita buněk při měření č. 19–27 vztažená ke 100% viabilitě (cell control)

5.3.4 MTT test (oplazmování s médiem zdroj č. 2, průtok prac. plynu 3 l/min)

Další graf (viz Obrázek 13) zobrazuje viabilitu buněk naměřenou pomocí MTT testu, kdy oplazmování zdrojem č. 2 (pochodňový mikrovlnný výboj) probíhalo již za přítomnosti 0,5 ml média v každé jamce, při nižším průtoku pracovního plynu (3 l/min).

Naše předpoklady toho, že u pochodňového mikrovlnného výboje (s ohledem na data získaná z *in vitro* testu hojení ran) budou zaznamenány vyšší hodnoty viabilit za stejně volených parametrů ve srovnání se zdrojem č. 1, se nepotvrdily. Hodnoty viabilit z měření č. 29, 30 a 31 (zdroj č. 2, pochodňový mikrovlnný výboj, nižší nastavený výkon 9 W, doby opracování 20, 30 a 2×10 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min) však jednoznačně přesáhly hodnotu viability tzv. cell control vždy minimálně o 10 %, což tedy prokázalo rychlejší hojení rány než u buněk neošetřených plazmatem.

Dále zde také vidíme, že nejnížší hodnota viability této série měření byla u měření č. 36 a to $68,51 \pm 3,06$ % (vyšší výkon 11 W, oplazmování s dvojitým opakováním po dobu 10 s), což je dostatečně vysoká hodnota značící zachování biologické aktivity buněk. Naopak nejvyšší hodnota viability byla stanovena u měření č. 29 a to $124,84 \pm 6,26$ % (nastaven nižší výkon 9 W, ošetření plazmatem po dobu 20 sekund a průtok pracovního plynu 3 l/min).

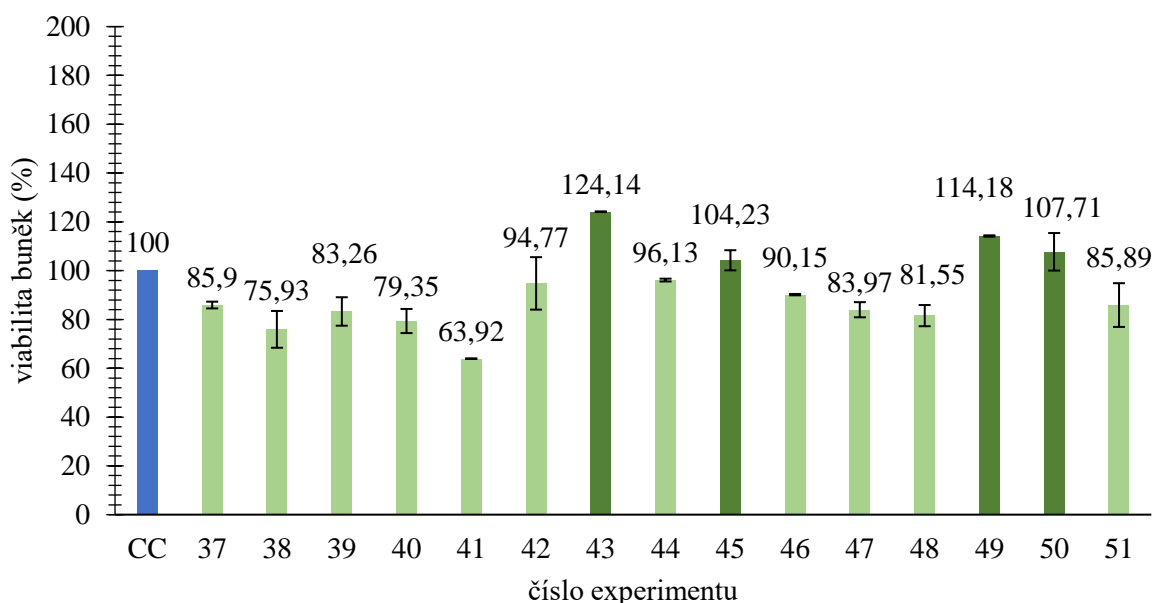


Obrázek 13: MTT test – Viabilita buněk při měření č. 28–36 vztažená ke 100% viabilitě (cell control)

5.3.5 MTT test (oplazmování s médiem, vyšší průtoky pracovního plynu)

V dalším grafu (viz Obrázek 14) probíhalo oplazmování v měřeních č. 37–51 zdrojem č. 2 (mikrovlnný pochodňový výboj) za přítomnosti 0,5 ml média v každé jamce, při vyšších průtocích pracovního plynu (4 a 5 l/min) dle tabulky (viz Tabulka 5).

Hodnoty viabilit měření č. 43 (vyšší výkon 11 W, oplazmování po dobu 20 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 45 (vyšší výkon 11 W, oplazmování po dobu 2×10sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 49 (vyšší výkon 11 W, oplazmování po dobu 30 sekund, průtok pracovního plynu 5 l/min) a č. 50 (vyšší výkon 11 W, oplazmování po dobu 2×10sekund, průtok pracovního plynu 5 l/min) přesáhly hodnotu viability tzv. cell control, což ukazuje rychlejší růst a regeneraci buněk než u buněk neovlivněných plazmatem. Nejvyšší hodnota viability byla naměřena u experimentu č. 43 (vyšší výkon 11 W, oplazmování po dobu 20 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min) a to hodnota $124,14 \pm 0,14$ %. Bohužel nejvyšší naměřené hodnoty nebyly zdaleka tak vysoké, jako v některých předchozích případech např. experiment č. 19 (nižší výkon 9 W, oplazmování po dobu 10 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min) s viabilitou $155,39 \pm 8,76$ %, což mohlo být způsobeno také vyšším průtokem pracovního plynu. Dále zde vidíme, že nejnižší hodnota viability této série měření byla u měření č. 41 a to $63,92 \pm 0,10$ % (nižší výkon 9 W, oplazmování s opakováním po dobu 30 sekund s pauzou 30 sekund o proudu pracovního plynu 4 l/min), což mohlo být způsobeno již dlouhou dobou oplazmování.



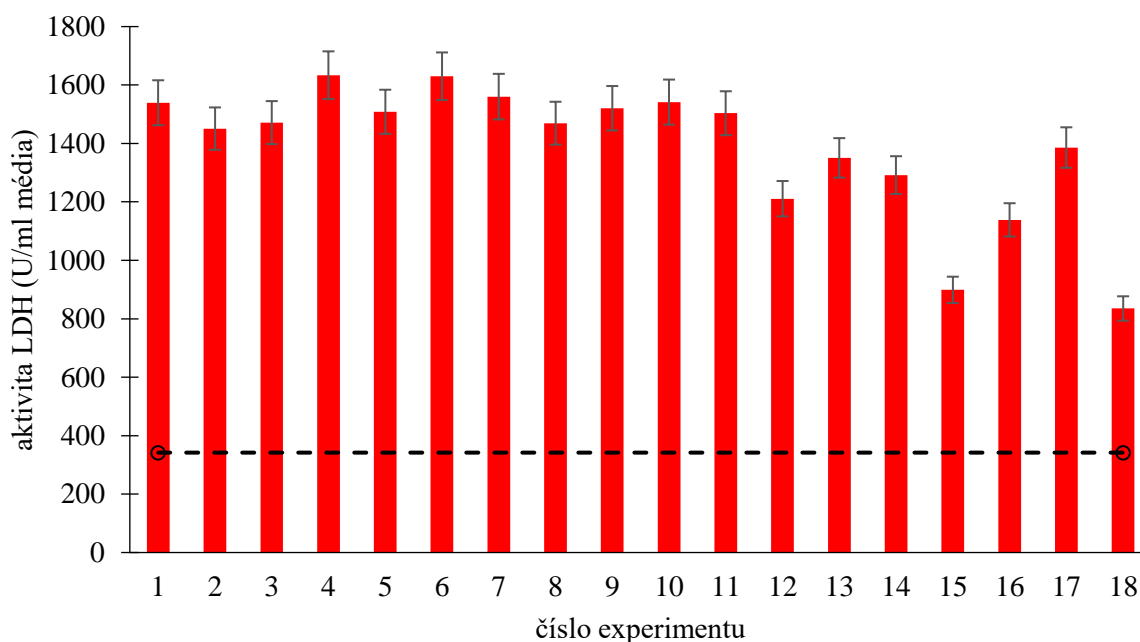
Obrázek 14: MTT test – Viabilita buněk při měření č. 37–51 vztažená ke 100% viabilitě (cell control)

Celkově lze říci, že při provádění standardního MTT testu za přítomnosti média nevykazovaly žádné z použitých parametrů ani zdrojů vůči keratinocytům žádné cytotoxické účinky a využití nízkoteplotního plazmatu při ošetření pokožky je tak bezpečné.

5.4 Vyhodnocení LDH testu

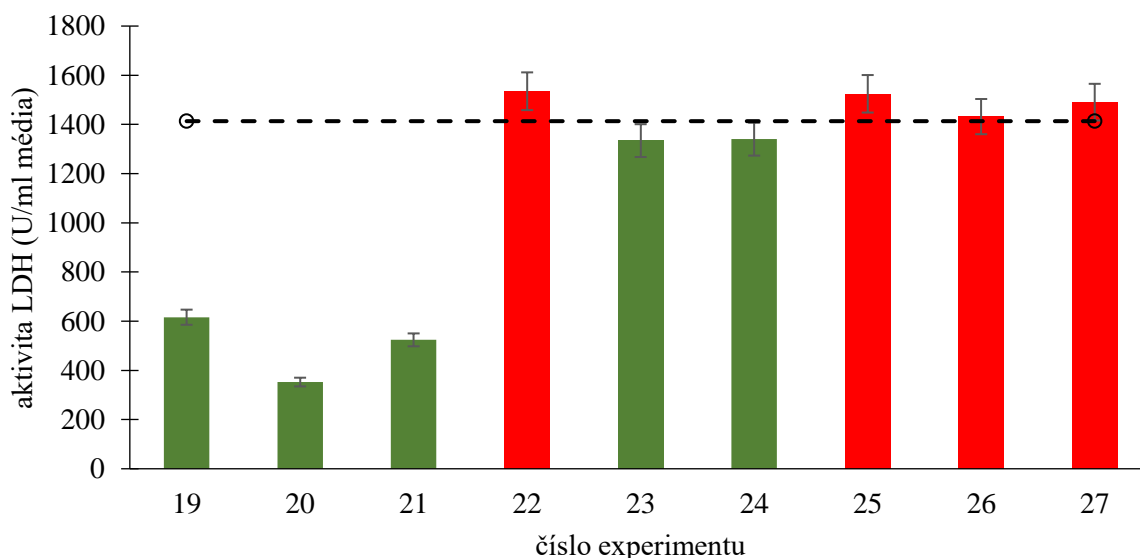
V následujících grafech jsou uvedeny výsledky LDH testů, které byly provedeny souběžně s měřením MTT testů pro kontrolu správnosti MTT testů. LDH test ukazuje aktivitu enzymu laktátdehydrogenázy (LDH) v médiu, které bylo odpipetováno při provádění MTT testů na keratinocytech. Čím vyšší je aktivita LDH, tím menší je viabilita buněk. V jednotlivých grafech je zaznamenána aktivita laktátdehydrogenázy kontroly, kde viabilita buněk byla považována za 100%. Čísla označení experimentů (č. 1–51) se shodují s označeními u MTT testů (viz Tabulka 4, Tabulka 5).

V grafu (viz Obrázek 15) vidíme, že data naměřená při LDH testu se v tomto případě shodují s výsledky MTT testu (viz Obrázek 11). Při ošetření buněk bez média byla u všech sledovaných parametrů, experimenty č. 1–18, zaznamenána ve srovnání kontrolou výrazná aktivita laktátdehydrogenázy značící rozpad buněk. Opět zde jistě hraje hlavní roli skutečnost, že bez média docházelo při oplazmování k vysušení buněk.



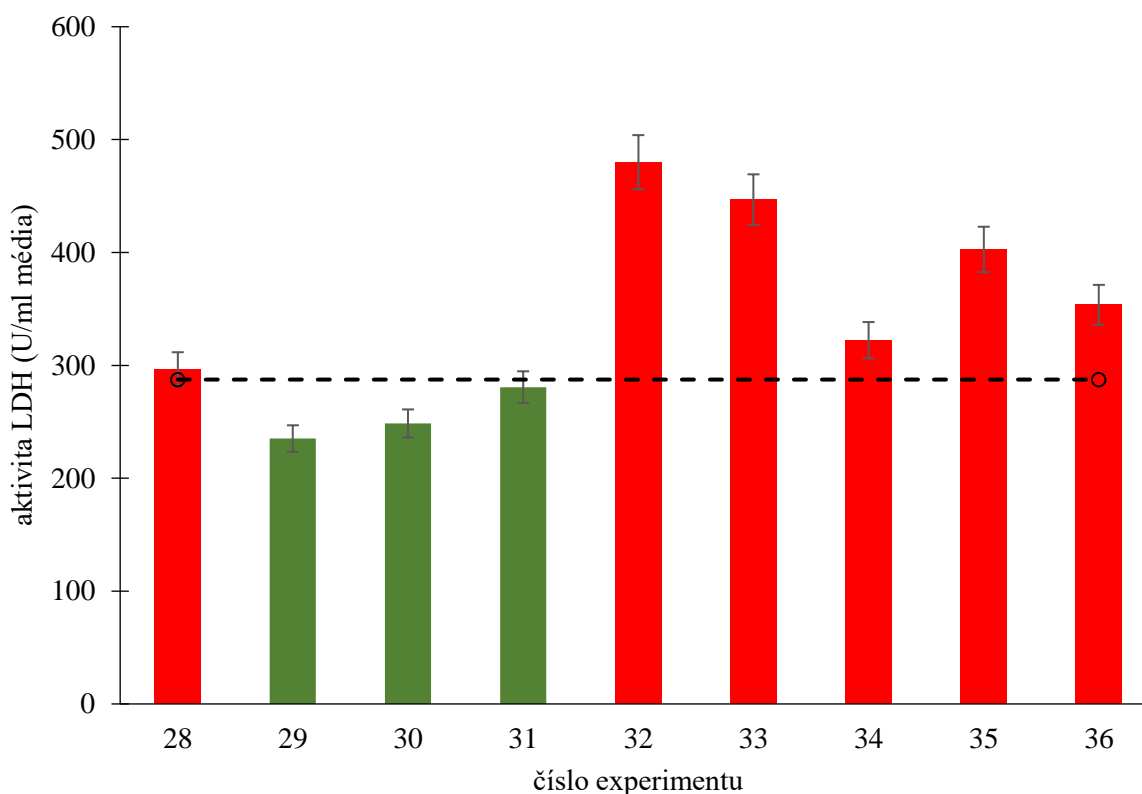
Obrázek 15: Aktivita enzymu laktátdehydrogenázy v médiu naměřená v experimentech č. 1–18

V grafu (viz Obrázek 16) se data naměřená při LDH testu opět shodují s výsledky MTT testu (viz Obrázek 12). Jelikož ale aktivita laktátdehydrogenázy kontroly byla velmi vysoká, což značí velkou část usmrčených buněk, nelze bohužel výsledky jednoznačně porovnat s výsledky MTT testu. Pokud by se přerušovaná čára (aktivita laktátdehydrogenázy u kontroly) pohybovala v nižší části grafu, byly by vyhovující parametry experimentů č. 19 (nižší výkon 9 W, doba opracování 10 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min), č. 20 (nižší výkon 9 W, doba opracování 20 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min), č. 21 (nižší výkon 9 W, doba opracování 30 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min), č. 23 (nižší výkon 9 W, doba opracování 2×30 sekund s pauzou 30 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min) a č. 24 (vyšší výkon 11 W, doba opracování 10 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min).



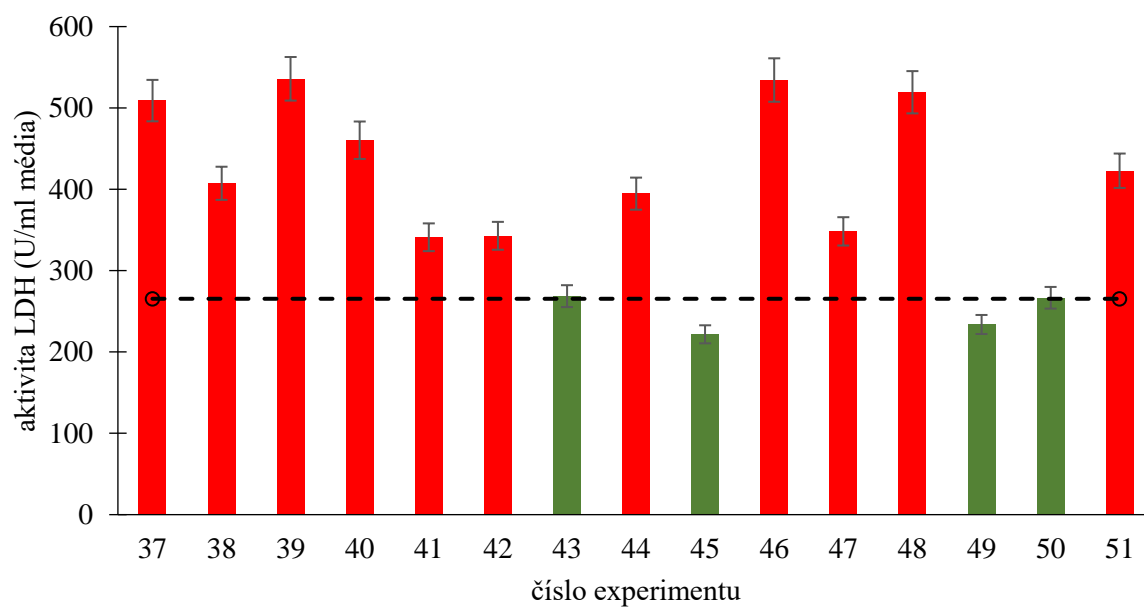
Obrázek 16: Aktivita enzymu laktátdehydrogenázy v médiu naměřená v experimentech č. 19–27

V grafu (viz Obrázek 17) se data naměřená při LDH testu také shodují s výsledky MTT testu (viz Obrázek 13). Přerušovaná čára opět značí aktivitu laktátdehydrogenázy v médiu kontroly. Parametry experimentů č. 29 (nižší výkon 9 W, doba opracování 20 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min), č. 30 (nižší výkon 9 W, doba opracování 30 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min) a č. 31 (nižší výkon 9 W, doba opracování 2×10 sekund s pauzou 10 sekund, nižší průtok pracovního plynu 3 l/min) tedy vyhovují pro použití při aplikacích pro urychlení procesu hojení ran.



Obrázek 17: Aktivita enzymu laktátdehydrogenázy v médiu naměřená v experimentech č. 28–36

V grafu (viz Obrázek 18) se data naměřená při LDH testu opět přibližně shodují s výsledky MTT testu (viz Obrázek 14). Aktivita laktátdehydrogenázy v médiu kontroly se blíží hodnotě 275 U/ml média, což odpovídá vysoké viabilitě buněk. Parametry experimentů č. 43 (vyšší výkon 11 W, doba opracování 20 sekund, vyšší průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 45 (vyšší výkon 11 W, doba opracování 2×10 sekund, s pauzou 10 sekund, vyšší průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 49 (vyšší výkon 11 W, doba opracování 30 sekund, vyšší průtok pracovního plynu 5 l/min) a č. 50 (vyšší výkon 11 W, doba opracování 2×10 sekund, s pauzou 10 sekund, vyšší průtok pracovního plynu 5 l/min) tedy vyhovují pro použití urychlení procesu hojení ran.



Obrázek 18: Aktivita enzymu laktátdehydrogenázy v médiu naměřená v experimentech č. 37–51

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování možného využití nízkoteplotního plazmatu při aplikacích pro urychlení procesu hojení ran.

Teoretická část práce byla zaměřena na popis kůže a procesu hojení kožních ran. Dále se tato část práce také zabývala charakterizací nízkoteplotního plazmatu a jeho účinků při procesu hojení ran.

V experimentální části byl nejprve s využitím dvou různých zdrojů nízkoteplotního plazmatu proveden *in vitro* test hojení ran. Zdrojem č. 1 byl mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou a jako zdroj č. 2 byl použit pochodňový mikrovlnný výboj. Test rychlosti hojení ran (scratch test) byl proveden na monovrstvě keratinocytů linie HaCaT a testování bylo uskutečněno za použití různých parametrů. Sledován byl především vliv doby ošetření plazmatem, dále také vliv použitého výkonu plazmového výboje a vliv průtoku pracovního plynu argonu.

Zdroj č. 1, tedy mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, významně neurychlil ve srovnání s kontrolou proces hojení ran při žádném z použitých nastavení. Umělá rána, až na ošetření při vyšším výkonu (11 W) a delší době opracování (30 sekund a 2×10 sekund), nebyla při použití tohoto zdroje po uplynutí 48 hodin zcela zacelena. Naproti tomu pochodňový mikrovlnný výboj tedy zdroj č. 2 naopak urychlil proces hojení umělé rány ve většině použitých nastavení. Rychlejší hojení rány oproti kontrole, probíhalo při měření č. 10, 12 a 14 tedy za využití nižšího výkonu 9 W a doby ošetření 10, 30 sekund a 2×30 sekund. Dále bylo zrychlení hojení rány pozorováno také při použití vyššího výkonu 11 W při měření č. 16 a 17 (doba ošetření 20 a 30 sekund). Zdroj č. 2 se tedy v těchto případech jeví jako potenciálně vhodný pro rychlejší hojení ran. Dále byl v práci proveden druhý test hojení ran, a to ve dvou sériích. Testován byl ale již pouze zdroj č. 2, který byl dle dosažených výsledků v předchozím testu vyhodnocen jako vhodnější. Při testování byly v obou sériích použity stejné parametry nastavení. První série byla ale ošetřena pouze jednou, naopak druhá série byla ošetřena dvakrát, a to v čase 0 hodin a 24 hodin. I v druhém testu hojení ran byly u většiny použitých nastavení potvrzeny pozitivní účinky plazmatu na urychlení procesu hojení. Rána se v tomto testu kompletně nezacelila pouze v případě měření č. 6 (výkon 11 W, doba opracování 10 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 23 (výkon 8 W, doba opracování 2×20 sekund s pauzou 24 hodin, průtok pracovního plynu 4 l/min), č. 27 (výkon 11 W, doba opracování 2×30 sekund s pauzou 24 hodin, průtok pracovního plynu 4 l/min). Obecně lze pak říci, že opakované ošetření plazmatem po 24 hodinách již nevedlo k významnému urychlení procesu hojení.

Dále byla v experimentální části této práce s využitím MTT testu cytotoxicity sledována také viabilita kožních buněk po jejich oplazmování při použití stejných podmínek jako u *in vitro* testu hojení ran. Nejprve byl proveden pokus s cílem vystavit buňky přímému kontaktu s výbojem plazmatu. Ošetření buněk v průběhu MTT testu tedy proběhlo bez přítomnosti média. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že všechna ošetření, která probíhala za nepřítomnosti média, způsobovala dle hodnot viabilit potenciální cytotoxický účinek. Keratinocyty byly zřejmě proudem nosného plynu při ošetření vysušeny. V dalším kroku byl proveden již standardní MTT test za přítomnosti média. V tomto případě pak již nevykazovaly žádné z použitých parametrů ani zdrojů vůči keratinocytům žádné cytotoxické účinky a využití nízkoteplotního plazmatu při ošetření pokožky lze tak považovat za bezpečné. Nevyšší hodnota viability $155,39 \pm 8,76 \%$ byla naměřena u stanovení č. 19 (mikrovlnný výboj s povrchovou

vlnou, výkon 9 W, oplazmování po dobu 10 sekund, průtok pracovního plynu 3 l/min), dále byla velmi vysoká viabilita buněk $150,61 \pm 0,82$ % změřena také u stanovení č. 20 (mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, výkon 9 W, oplazmování po dobu 20 sekund, průtok pracovního plynu 3 l/min) a rovněž vysokou viabilitu $151,27 \pm 17,37$ % vykazovaly buňky i u stanovení č. 21 (mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou, výkon 9 W, oplazmování po dobu 30 sekund, průtok pracovního plynu 3 l/min).

Pro ověření správnosti MTT testů byly souběžně provedeny také LDH testy cytotoxicity a z dosažených výsledků lze konstatovat, že výsledky obou stanovení se shodují a použití plazmové trysky při aplikacích pro zrychlení hojení ran je bezpečné.

Z našich výsledků tedy usuzujeme, že zdroj č. 1 (mikrovlnný výboj s povrchovou vlnou) a především zdroj č. 2 (pochodňový mikrovlnný výboj) při správně nastavených parametrech umožňují urychlené hojení ran a nepůsobí na kožní buňky cytotoxicky. V budoucnu bude ale nutné ještě podrobněji otestovat jednotlivé nastavené parametry oplazmování. Působení plazmatu na kožní buňky se ale jeví jako potenciálně rychlá, levná a účinná metoda pro hojení kožních ran či chronických defektů.

7 SEZNAM ZKRATEK

UV	ultrafialové záření
UVB	středněvlnné ultrafialové záření
AMP	antimikrobiální peptidy
ECM	extracelulární matrix
TGF- β 1	transformující růstový faktor beta 1
EGF	epidermální růstový faktor
TGF α	transformující růstový faktor alfa
PDGF	růstový faktor odvozený od krevních destiček
FGF	fibroblastový růstový faktor
KGF	keratinocytový růstový faktor
ECM	extracelulární matrix
CAPP	nízkoteplotní plazma za atmosférického tlaku
LTP	nízkoteplotní plazma
UVC	krátkovlnné ultrafialové záření
NADH	nikotinamidadeninukleotid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
MO	mikroorganismus
N	počet životaschopných buněk
A	absorbance
HaCaT	humánní keratinocytová linie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	fetální bovinní sérum
DMSO	dimethylsulfoxid
ATB	antibiotikum
PBS	fosfátový pufr
DMSO	dimethylsulfoxid
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid oxidovaná forma
RCF	relativní odstředivá síla
LDH	laktátdehydrogenáza
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

8 ZDROJE

- [1] ABDO, Joseph M., Nikolai A. SOPKO a Stephen M. MILNER. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine* [online]. 2020, 28 [cit. 2020-09-29]. ISSN 22139095. Dostupné z: doi:10.1016/j.wndm.2020.100179
- [2] GRAVITZ, Lauren, Nikolai A. SOPKO a Stephen M. MILNER. Skin: A model for regeneration. *Nature* [online]. 2018, 563(7732), S83-S83 [cit. 2020-09-29]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/d41586-018-07428-4
- [3] HAMBLIN, Michael R., Pinar AVCI a Tarl W. PROW., ed., [2016]. *Nanoscience in dermatology*. London, United Kingdom: Academic Press is an imprint of Elsevier, s. 1-14. ISBN 978-0-12-802926-8.
- [4] PROKSCH, Ehrhardt, Johanna M. BRANDNER a Jens-Michael JENSEN, 2008. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology* [online]. 17(12), 1063-1072 [cit. 2020-10-21]. ISSN 09066705. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x
- [5] CLAUSEN, Maja-Lisa a Tove AGNER, 2016. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. *Skin Barrier Function* [online]. S. Karger, 49, 38-46 [cit. 2020-10-21]. Current Problems in Dermatology. ISBN 978-3-318-05585-6. Dostupné z: doi:10.1159/000441543
- [6] D'ORAZIO, John, Stuart JARRETT, Alexandra AMARO-ORTIZ a Timothy SCOTT, 2013. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 14(6), 12222-12248 [cit. 2020-10-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms140612222
- [7] SHEIPOURI, Sheipouri D, Braidy N, Guillemin GJ., N. BRAIDY a GJ. GUILLEMIN, 2012. Kynurenine Pathway in Skin Cells: Implications for UV-Induced Skin Damage. *Int J Tryptophan Res.* [online]. (5), 15-25 [cit. 2020-10-21]. PMID: 22837645. Dostupné z: doi:10.4137/IJTR.S9835
- [8] ROGER, Mathilde, Nicola FULLARD, Lydia COSTELLO, et al., 2019. Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy* [online]. 234(4), 438-455 [cit. 2020-10-21]. ISSN 0021-8782. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12942
- [9] KOLARSICK, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin: A model for regeneration. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2011, 3(4), 203-213 [cit. 2020-09-29]. ISSN 1945-760X. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98
- [10] SAHLE, Fitsum F., Tsige GEBRE-MARIAM, Bodo DOBNER, Johannes WOHLRAB a Reinhard H.H. NEUBERT. Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy: A model for regeneration. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2015, 28(1), 42-55 [cit. 2020-09-29]. ISSN 1660-5535. Dostupné z: doi:10.1159/000360009
- [11] YOUSEF, H., M. ALHAJJ a S.A. SHARMA. Skin (Integument), Epidermis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020, 29.3.2020 [cit. 2020-09-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>

- [12] BROWN, Thomas M. a Karthik KRISHNAMURTHY, 2020. Histology, Dermis. *StatPearls [Internet]* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 1-14 [cit. 2020-10-21]. PMID: 30570967, NBK535346. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>
- [13] VALLE, Maura a Maria Pia ZAMORANI, 2007. Skin and Subcutaneous Tissue. *Ultrasound of the Musculoskeletal System* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 19-43 [cit. 2020-10-21]. Medical Radiology. ISBN 978-3-540-42267-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-28163-4_2
- [14] SORG, Heiko, Daniel J. TILKORN, Stephan HAGER, Jörg HAUSER a Ursula MIRASTSCHIKSKI, 2017. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research* [online]. 58(1-2), 81-94 [cit. 2020-09-29]. ISSN 0014-312X. Dostupné z: doi:10.1159/000454919
- [15] HESS, C., 2012. *Clinical Guide to Skin and Wound Care* [online]. 7. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins [cit. 2020-09-30]. ISBN 9781451148732. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=NdoPAAAAQBAJ&lpg=PA3&hl=cs&pg=PA5-IA2#v=onepage&q&f=false>
- [16] NETHI, Susheel Kumar, Sourav DAS, Chitta Ranjan PATRA a Sudip MUKHERJEE, 2019. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomaterials Science* [online]. 7(7), 2652-2674 [cit. 2020-10-10]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C9BM00423H
- [17] THEORET, Christine, 2016. Physiology of Wound Healing. *Equine Wound Management* [online]. 1. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2016-10-18, s. 1-13 [cit. 2020-09-30]. ISBN 9781118999219. Dostupné z: doi:10.1002/9781118999219.ch1
- [18] FONTANA, J. a P. LAVŘÍKOVÁ, 2014. 4. Hemostáza. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. SIGILLUM FACULTATIS MEDICAE TERTIAE UNIVERSITATIS CAROLINAE: 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague [cit. 2020-09-30]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/4-hemostaza/>
- [19] REINKE, J.M. a H. SORG, 2012. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research* [online]. 49(1), 35-43 [cit. 2020-10-04]. ISSN 1421-9921. Dostupné z: doi:10.1159/000339613
- [20] PARRISH, William R., 2017. Physiology of Blood Components in Wound Healing: an Appreciation of Cellular Co-Operativity in Platelet Rich Plasma Action. *Journal of Exercise Sports & Orthopedics* [online]. 4(2), 1-14 [cit. 2020-10-08]. ISSN 2374-6904. Dostupné z: doi:10.15226/2374-6904/4/2/00156
- [21] CHILDS, Dylan R. a Ananth S. MURTHY, 2017. Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America* [online]. 97(1), 189-207 [cit. 2020-10-08]. ISSN 0039-6109. Dostupné z: doi:10.1016/j.suc.2016.08.013
- [22] PASTAR, Irena, Olivera STOJADINOVIC, Natalie C. YIN, et al., 2014. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care* [online]. 3(7), 445-464 [cit. 2020-10-15]. ISSN 2162-1918. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2013.0473

- [23] BOGAERTS, Annemie a Gabriele CENTI, 2020. Plasma Technology for CO2 Conversion: A Personal Perspective on Prospects and Gaps. *Frontiers in Energy Research* [online]. 8, 1 [cit. 2020-10-10]. ISSN 2296-598X. Dostupné z: doi:10.3389/fenrg.2020.00111
- [24] ŠIMONČICOVÁ, Juliana, Svetlana KRYŠTOFOVÁ, Veronika MEDVECKÁ, Kamila ĎURIŠOVÁ a Barbora KALIŇÁKOVÁ, 2019. Technical applications of plasma treatments: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 103(13), 5117-5129 [cit. 2020-10-10]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-019-09877-x
- [25] GAO, Lingge, Xingmin SHI a Xili WU, 2020. Applications and challenges of low temperature plasma in pharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. [cit. 2020-10-10]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2020.05.001
- [26] [2012]. LAROUSSI, M., M. KONG, G. MORFILL a W. STOLZ. *Plasma Medicine*. New York: Cambridge University Press, s. 4-28. ISBN 978-1-107-00643-0.
- [27] FU, Wenjie, Chaoyang ZHANG, Cong NIE, Xiaoyun LI a Yang YAN, 2019. A high efficiency low-temperature microwave-driven atmospheric pressure plasma jet. *Applied Physics Letters* [online]. 114(25) [cit. 2020-10-15]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.5108538
- [28] TSONEV, Ivan, Nikolai ATANASOV, Gabriela ATANASOVA, Frantisek KRCMA a Todor BOGDANOV, 2018. Atmospheric Pressure Microwave Plasma Torch for Biomedical Applications. *Plasma Medicine* [online]. 8(4), 403-409 [cit. 2020-10-15]. ISSN 1947-5764. Dostupné z: doi:10.1615/PlasmaMed.2019028816
- [29] CUI, Hui Song, YoonSoo CHO, So Young JOO, ChinHee MUN, CheongHoon SEO a June-Bum KIM, 2019. Wound Healing Potential of Low Temperature Plasma in Human Primary Epidermal Keratinocytes. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 16(6), 585-593 [cit. 2020-10-15]. ISSN 1738-2696. Dostupné z: doi:10.1007/s13770-019-00215-w
- [30] ASSADIAN, Ojan, Karen J. OUSEY, George DAESCHLEIN, Axel KRAMER, Christina PARKER, Judith TANNER a David J. LEAPER, 2018. Effects and safety of atmospheric low-temperature plasma on bacterial reduction in chronic wounds and wound size reduction: A systematic review and meta-analysis. *International Wound Journal* [online]. 16(1), 103-111 [cit. 2020-10-15]. ISSN 1742-4801. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12999
- [31] XU, Guimin, Jingfen CAI, Sile CHEN, Congwei YAO, Ping LI, Xingmin SHI a Guan-jun ZHANG, 2016. Effects of low temperature atmospheric pressure plasma on skin wound healing of mice in vivo. In: *2016 IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS)*. Banff, Alberta, Canada: IEEE, 2016, s. 1-1. ISBN 978-1-4673-9601-1. ISSN 0730-9244. Dostupné z: doi:10.1109/PLASMA.2016.7534233
- [32] TREBULOVÁ, Kristína, František KRČMA, Zdenka KOZÁKOVÁ a Petra MATOUŠKOVÁ, 2020. Impact of Microwave Plasma Torch on the Yeast *Candida glabrata*. *Applied Sciences* [online]. 10(16) [cit. 2020-10-15]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10165538

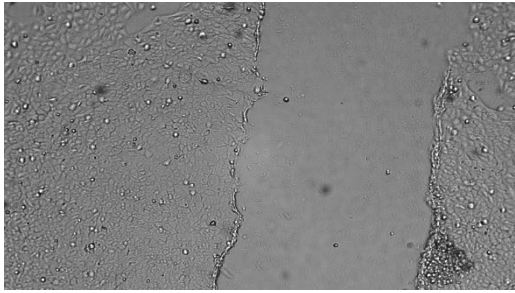
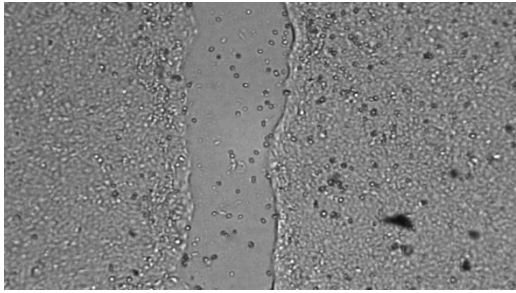
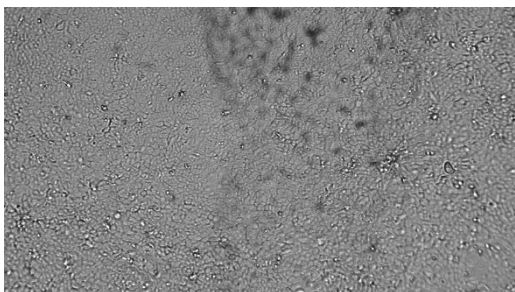
- [33] DUCHESNE, Constance, Nadira FRESCALINE, Jean-Jacques LATAILLADE a Antoine ROUSSEAU, 2018. Comparative Study between Direct and Indirect Treatment with Cold Atmospheric Plasma on In Vitro and In Vivo Models of Wound Healing. *Plasma Medicine* [online]. 8(4), 379-401 [cit. 2020-10-16]. ISSN 1947-5764. Dostupné z: doi:10.1615/PlasmaMed.2019028659
- [34] BRANÝ, Dušan, Dana DVORSKÁ, Erika HALAŠOVÁ a Henrieta ŠKOVIEROVÁ, 2020. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 21(8) [cit. 2020-10-22]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21082932
- [35] HIRST, Adam M., Fiona M. FRAME, Norman J. MAITLAND a Deborah O'CONNELL, 2014. Low Temperature Plasma: A Novel Focal Therapy for Localized Prostate Cancer? *BioMed Research International* [online]. 2014, 1-15 [cit. 2020-10-22]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/878319
- [36] COLOMBO, Irma, Enrico SANGIOVANNI, Roberta MAGGIO, et al., 2017. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation* [online]. 2017, 1-12 [cit. 2020-10-16]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2017/7435621
- [37] LI, WEIJIA, JING ZHOU a YUYIN XU, 2015. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports* [online]. 3(5), 617-620 [cit. 2020-10-16]. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2015.481
- [38] ASLANTÜRK, Özlem Sultan, 2018. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. InTech, 2018-07-11 [cit. 2020-10-16]. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923
- [39] KARAKAŞ, Didem, Ferda ARI a Engin ULUKAYA, 2017. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY* [online]. 41, 919-925 [cit. 2020-10-16]. ISSN 13000152. Dostupné z: doi:10.3906/biy-1703-104
- [40] PARHAMIFAR, Ladan, Helene ANDERSEN a S. Moein MOGHIMI, 2013. Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2013-9-14, 13-22 [cit. 2020-10-16]. ISBN 978-1-62703-139-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-140-0_2
- [41] KAJA, Simon, Andrew J. PAYNE, Yuliya NAUMCHUK a Peter KOULEN, 2018. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Current Protocols in Toxicology* [online]. 72(1) [cit. 2020-10-16]. ISSN 1934-9254. Dostupné z: doi:10.1002/cptx.21
- [42] CORY, Giles, 2011. Scratch-Wound Assay. *Cell Migration* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011-6-17, vol 769, 25-30 [cit. 2020-10-16]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-206-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-207-6_2

- [43] DUCHESNE, Constance, Nadira FRESCALINE, Jean-Jacques LATAILLADE a Antoine ROUSSEAU, 2018. Comparative Study between Direct and IndirectTreatmentwithColdAtmospheric Plasma on In Vitro and In Vivo Models of WoundHealing. *Plasma Medicine* [online]. 8(4), 379-401 [cit. 2020-10-16]. ISSN 1947-5764. Dostupné z: doi:10.1615/PlasmaMed.2019028659
- [44] GRADA, Ayman, Marta OTERO-VINAS, Francisco PRIETO-CASTRILLO, Zaidal OBAGI a Vincent FALANGA, 2017. ResearchTechniques Made Simple: Analysis of Collective Cell MigrationUsingtheWoundHealing Assay. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 137(2), e11-e16 [cit. 2020-10-16]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2016.11.020

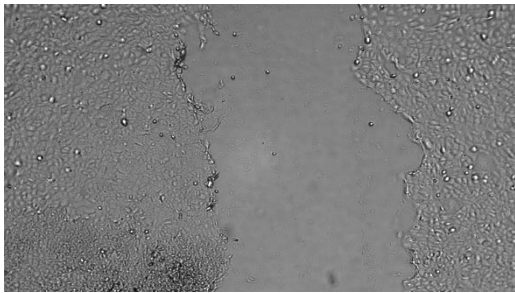
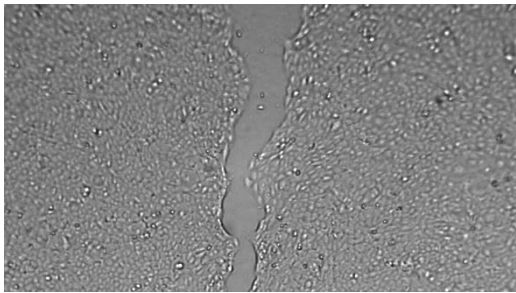
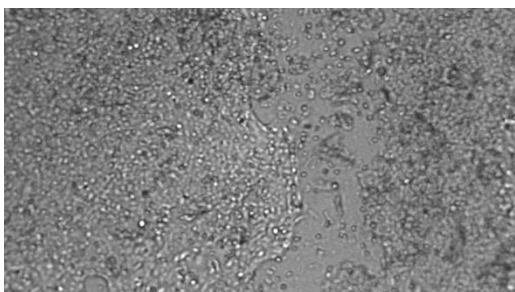
9 PŘÍLOHY

9.1 Detailní snímky průběhu scratch testu č. 1

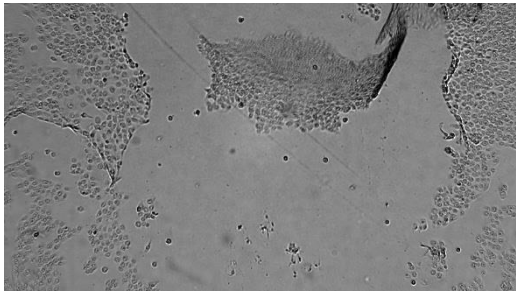
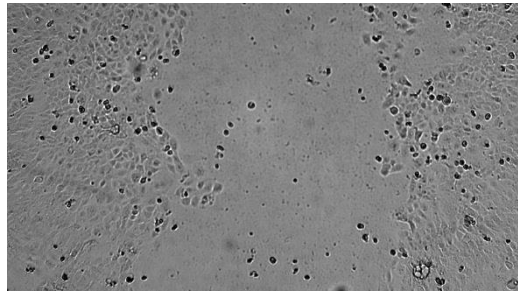
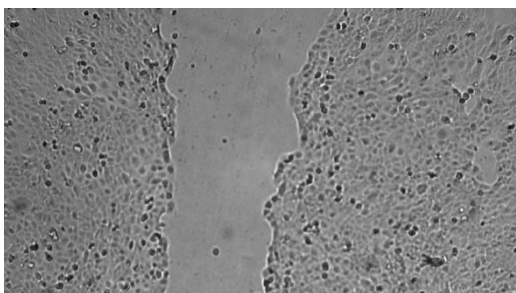
Scratch test č. 1, kontrolní test (0 h, 24 h, 48 h), bez oplazmování, zvětšení 100×

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 61 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

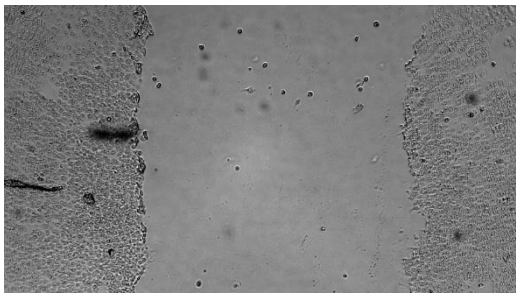
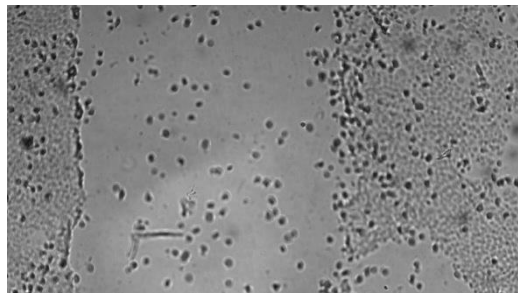
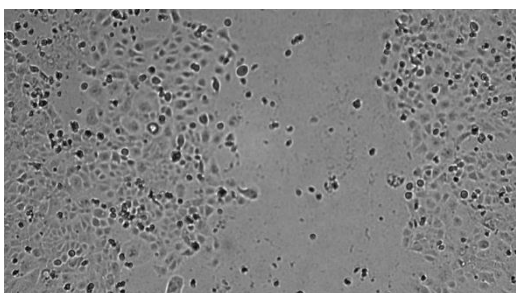
Scratch test č. 1, měření č. 1 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 9 W, doba opracování 10 s, zvětšení 100×

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 70 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 80 % 	

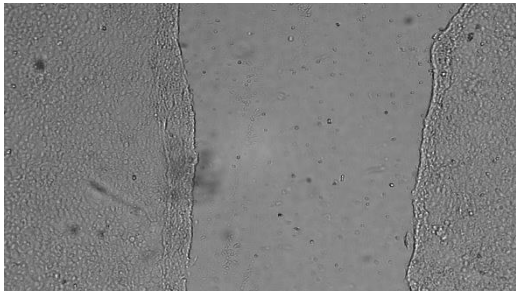
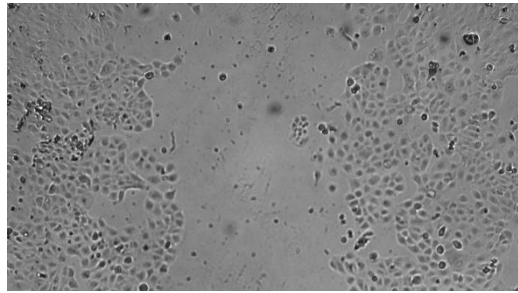
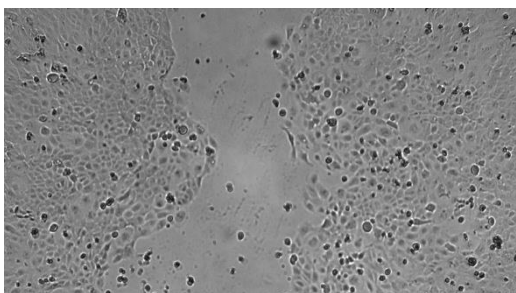
Scratch test č. 1, měření č. 2 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 9 W, doba opracování 20 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 37,5 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 62,5 % 	

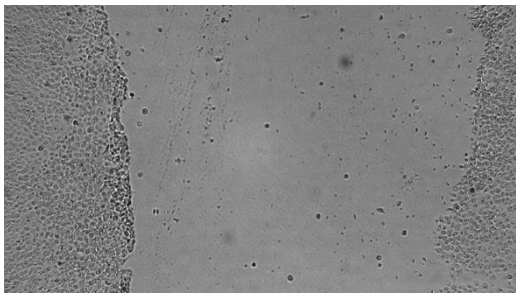
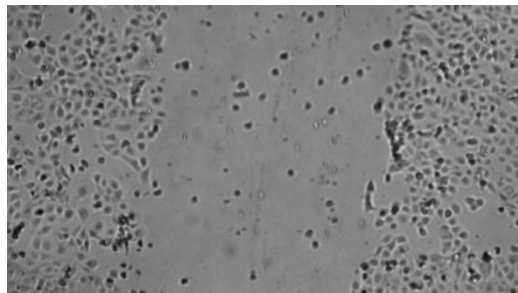
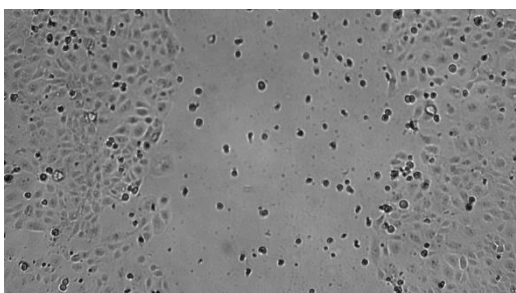
Scratch test č. 1, měření č. 3 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 9 W, doba opracování 30 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 10 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 50 % 	

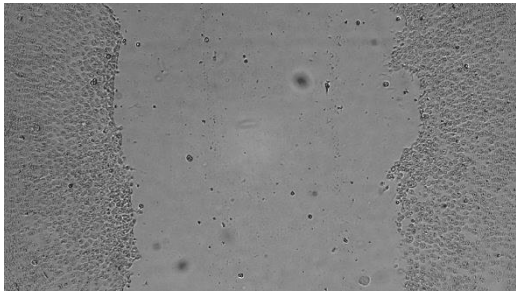
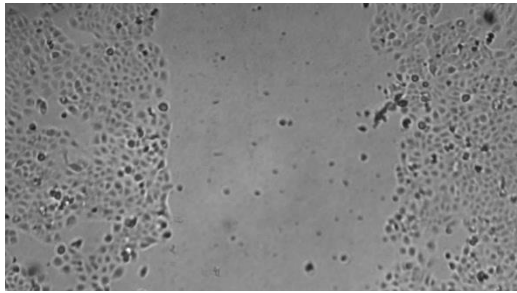
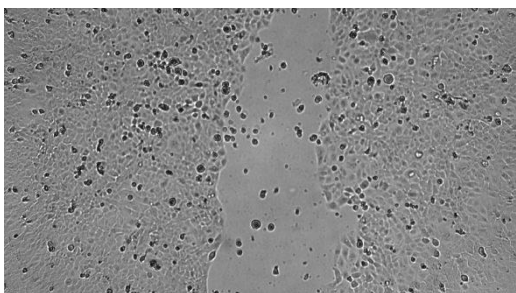
Scratch test č. 1, měření č. 4 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 9 W, doba opracování 2×10 s s pauzou 10 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 40 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 60 % 	


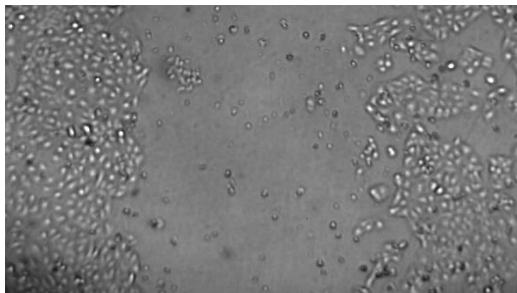
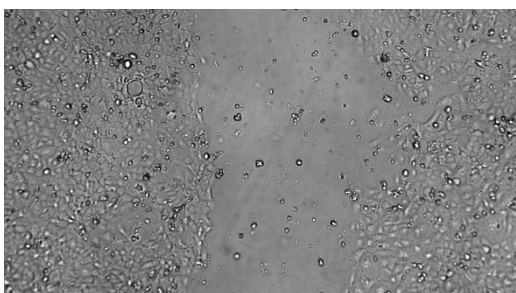
Scratch test č. 1, měření č. 5 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 9 W, doba opracování 2×30 s s pauzou 30 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 37,5 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 39 % 	

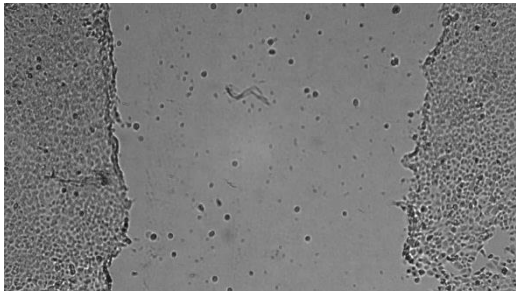
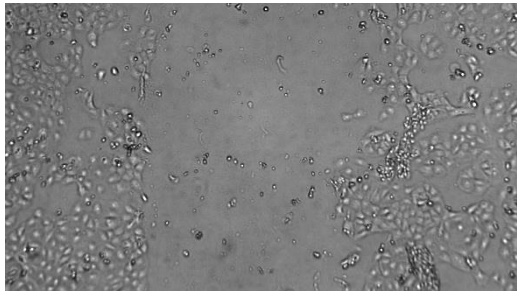
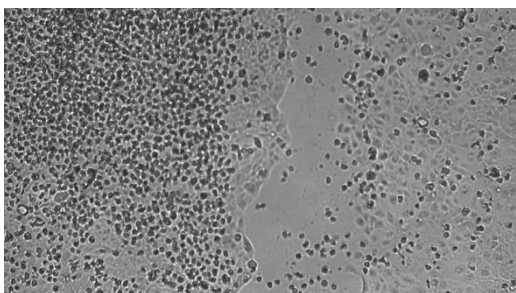
Scratch test č. 1, měření č. 6 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 11 W, doba opracování 10 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 29 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 72 % 	

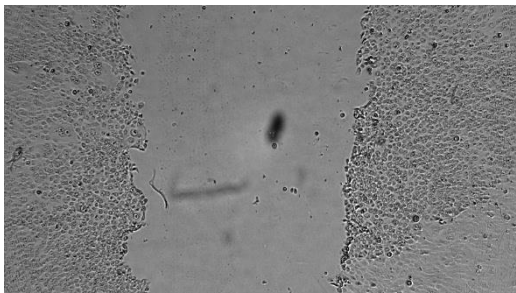
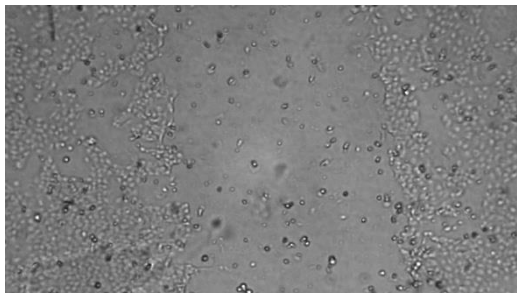
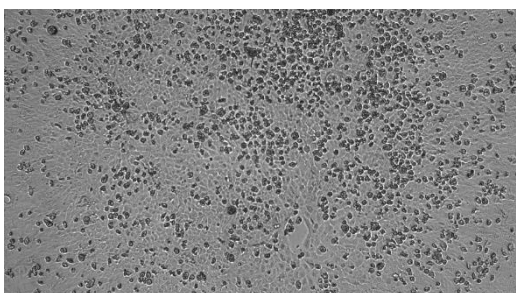
Scratch test č. 1, měření č. 7 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 11 W, doba opracování 20 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 22 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 37,5 % 	

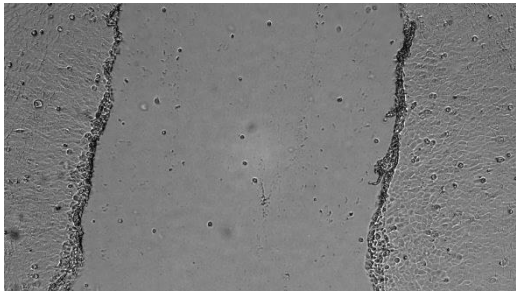
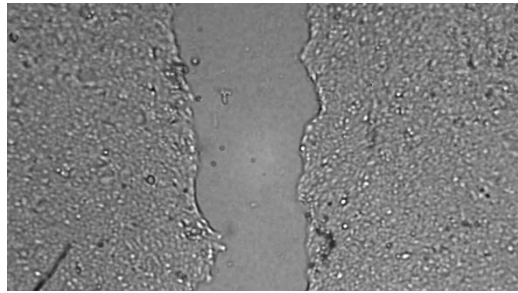

Scratch test č. 1, měření č. 8 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 11 W, doba opracování 30 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 13 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

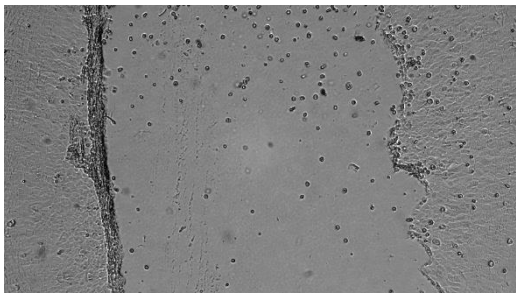
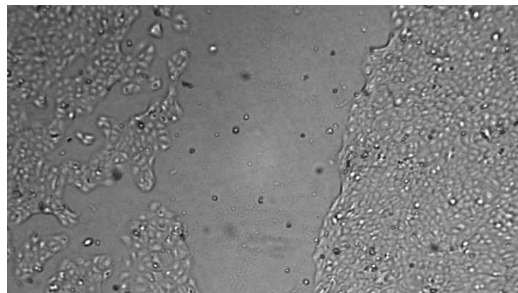
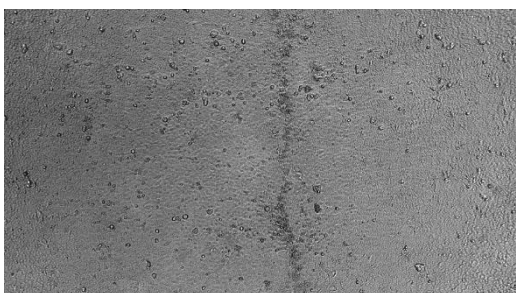
Scratch test č. 1, měření č. 9 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 1, výkon 11 W, doba opracování 2×10 s s pauzou 10 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 8 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

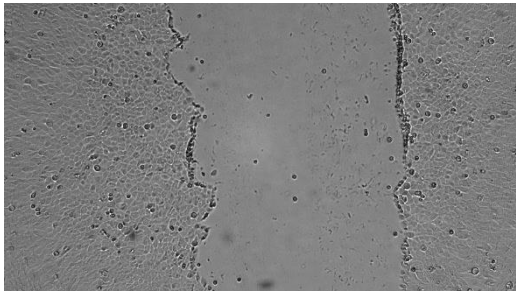
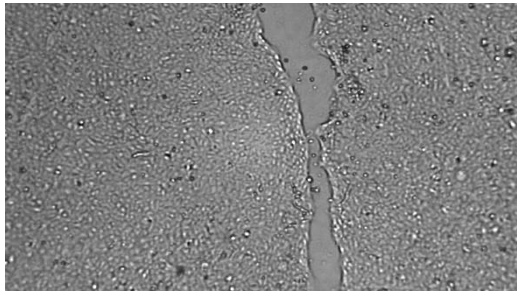
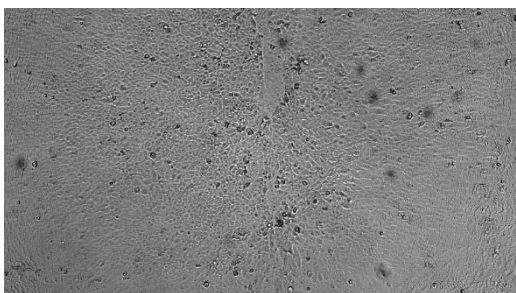
Scratch test č. 1, měření č. 10 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 9 W, doba opracování 10 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 66 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

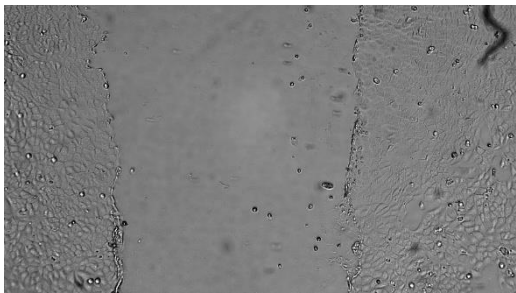
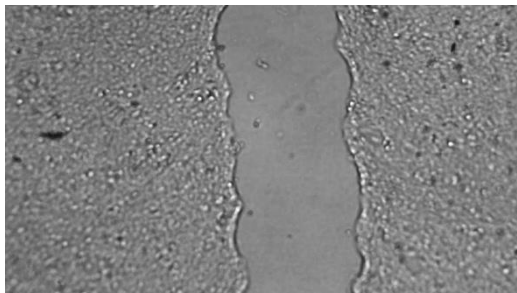
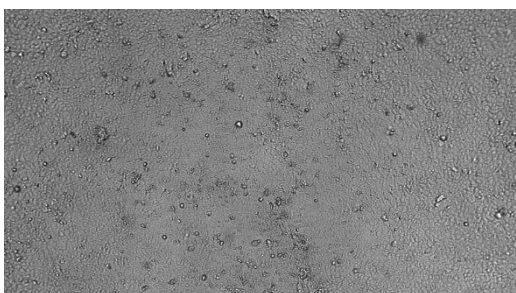
Scratch test č. 1, měření č. 11 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 9 W, doba opracování 20 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 43 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

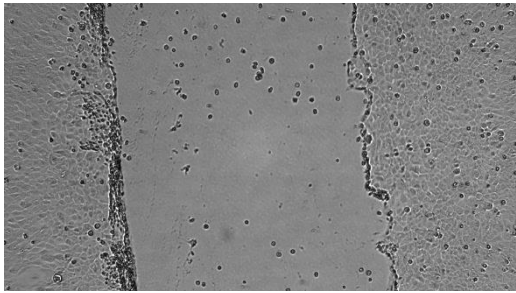
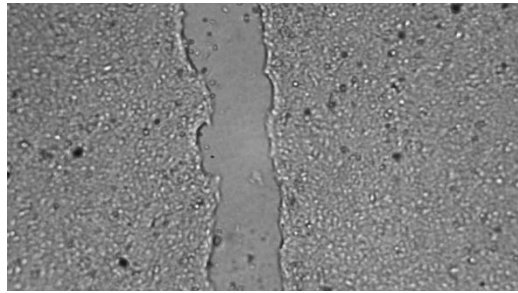

Scratch test č. 1, měření č. 12 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 9 W, doba opracování 30 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 85 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

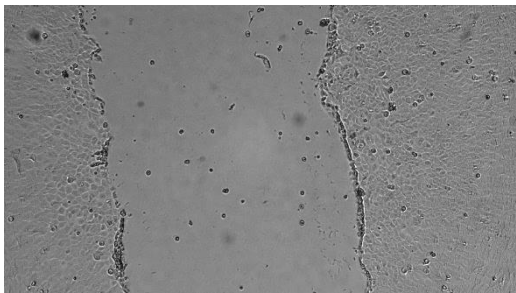
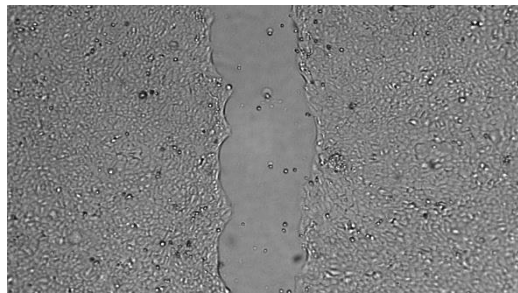

Scratch test č. 1, měření č. 13 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 9 W, doba opracování 2×10 s s pauzou 10 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 46 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

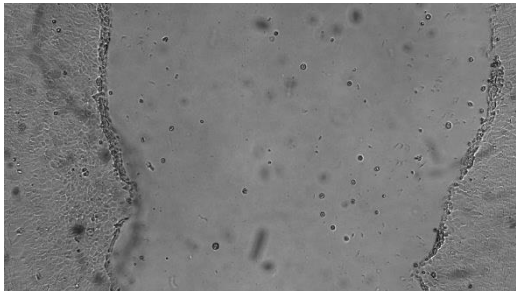
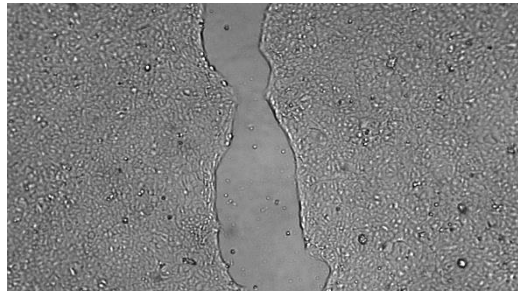
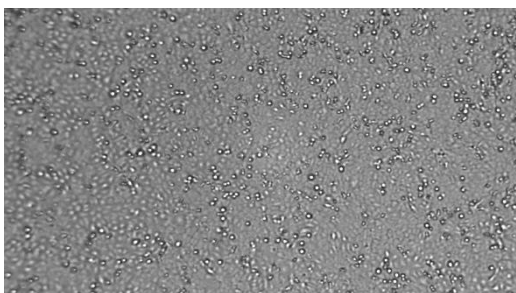
*Scratch test č. 1, měření č. 14 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 9 W, doba opracování
2×30 s s pauzou 30 s, zvětšení 100x*

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 70 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

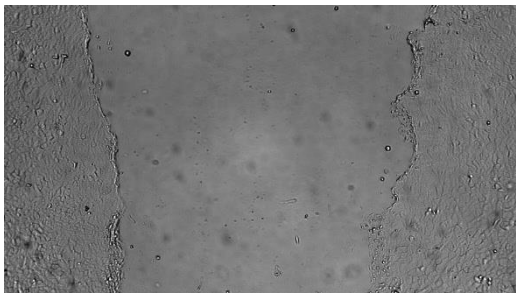
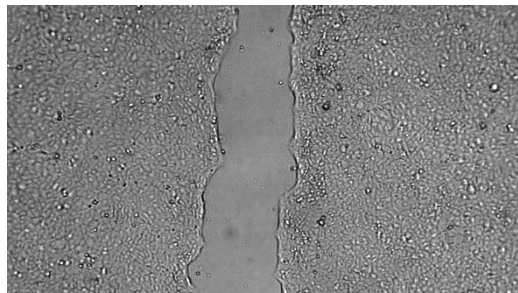
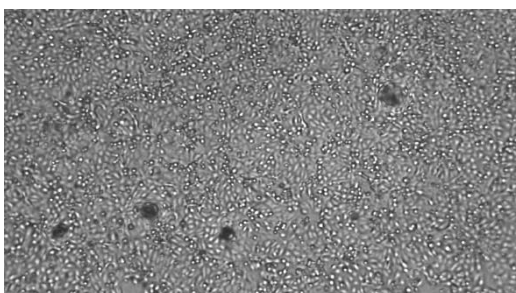
*Scratch test č. 1, měření č. 15 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba opracování 10 s, zvětšení
100x*

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 60 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 92 % 	

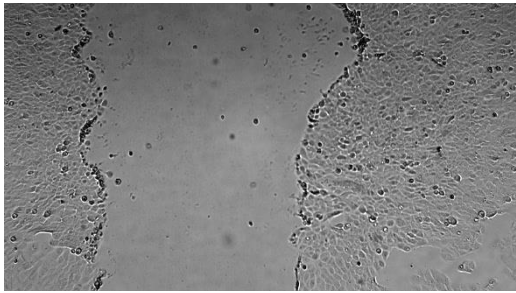
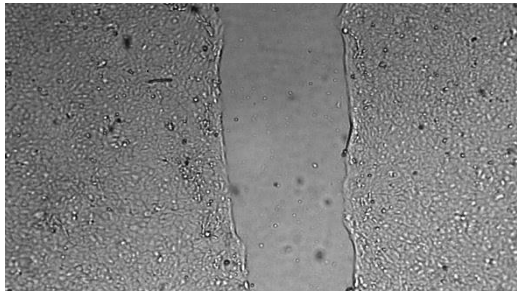
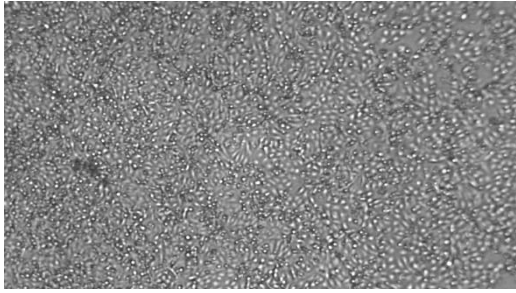
Scratch test č. 1, měření č. 16 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba opracování 20 s, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 75 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

Scratch test č. 1, měření č. 17 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba opracování 30 s, zvětšení 100x

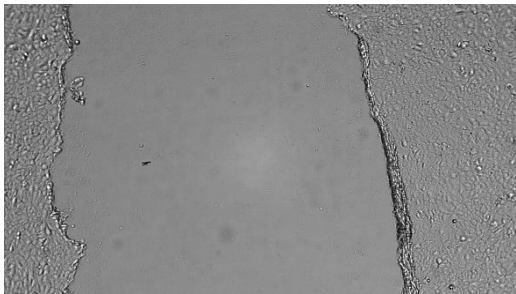
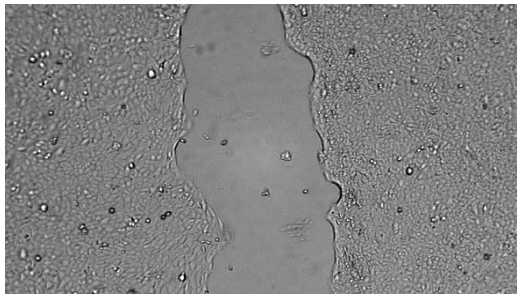
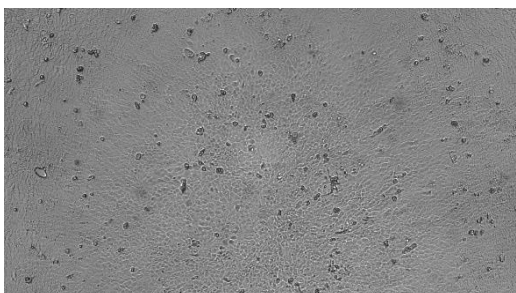
0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 77 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

*Scratch test č. 1, měření č. 18 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba opracování
2×10 s s pauzou 10 s, zvětšení 100x*

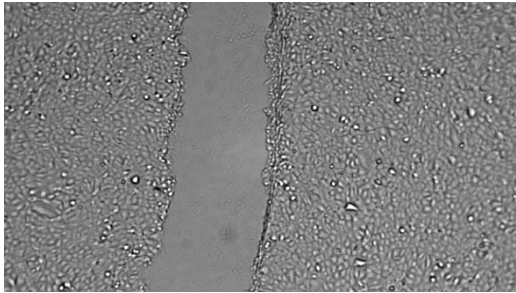
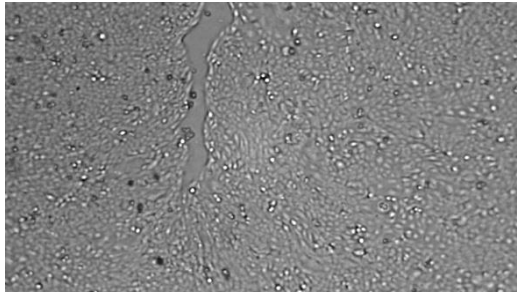
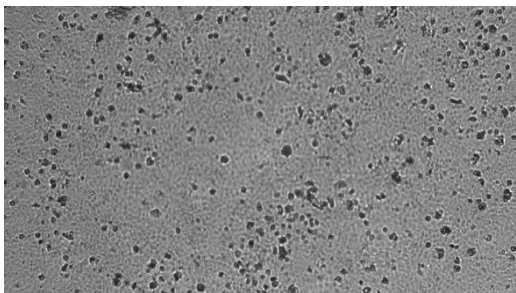
0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 40 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

9.2 Detailní snímky průběhu scratch testu č. 2

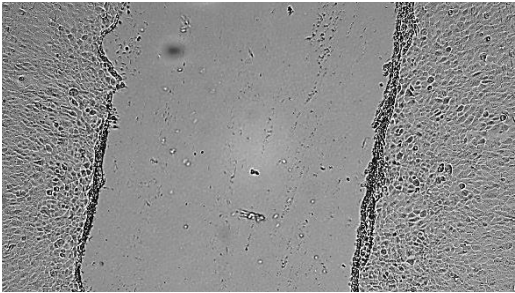
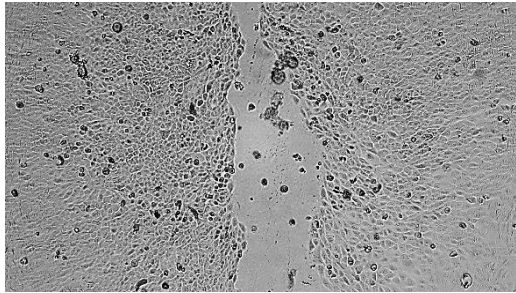
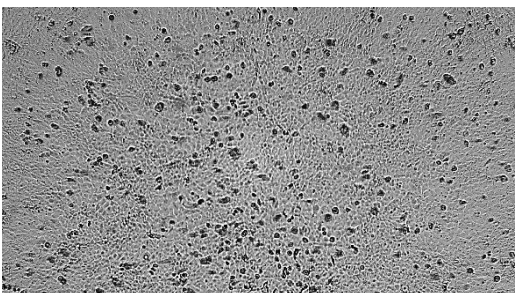
Scratch test č. 2, kontrola (0 h, 24 h, 48 h), bez oplazmování, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 57 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

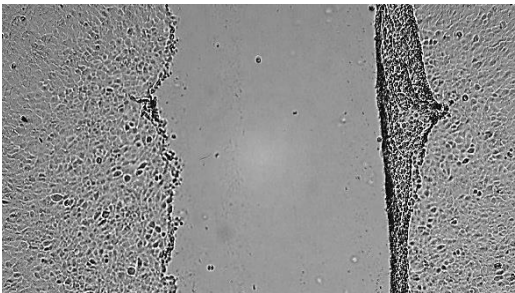
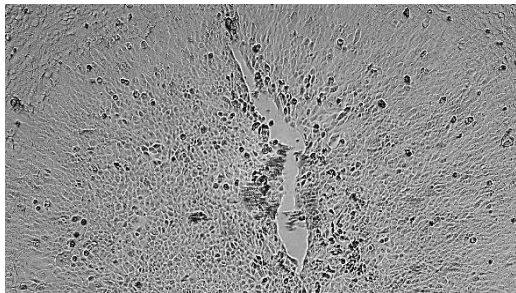
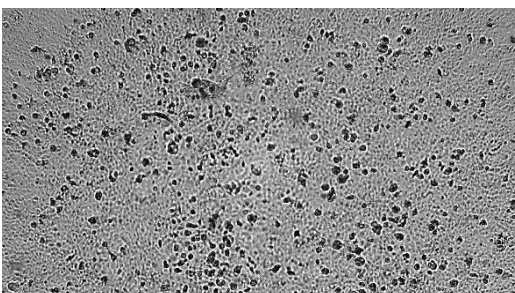
Scratch test č. 2, měření č. 1 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 10 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 84 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

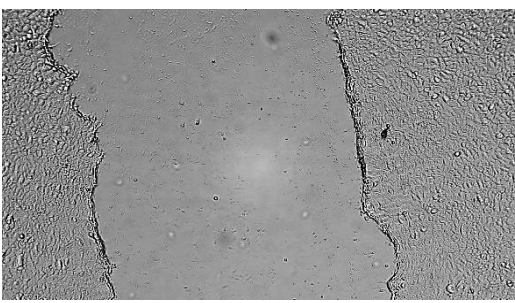
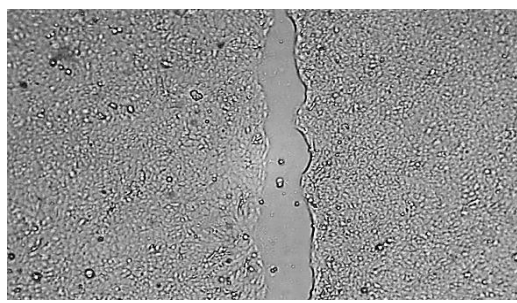
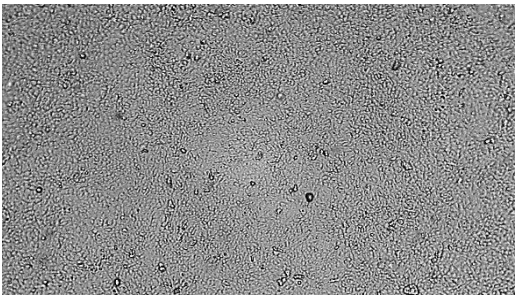
Scratch test č. 2, měření č. 2 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 20 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 70 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

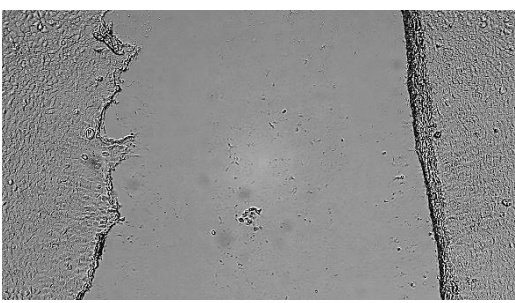
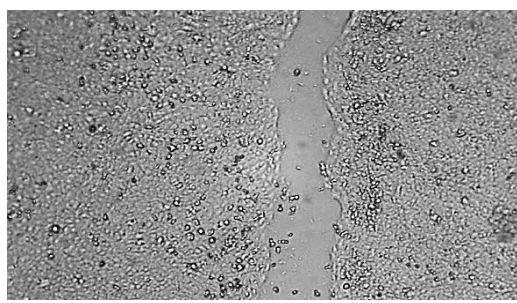
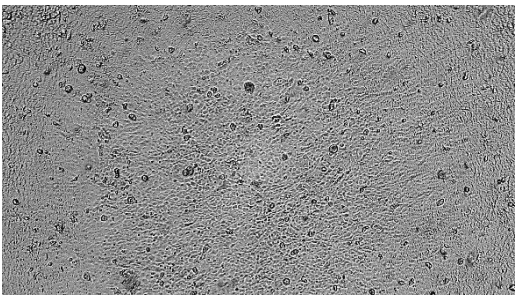
Scratch test č. 2, měření č. 3 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 30 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 89 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

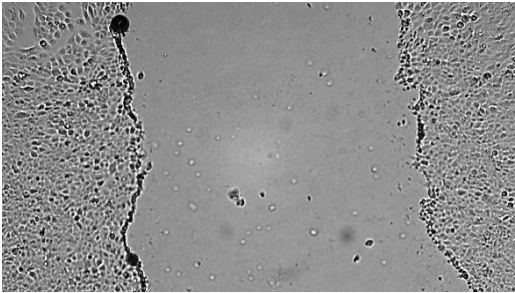
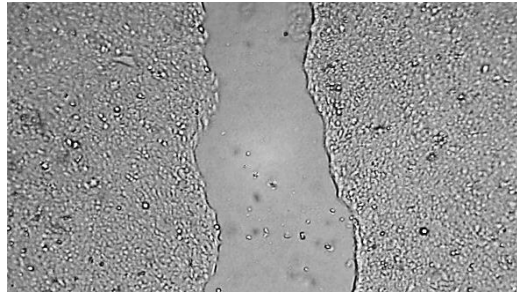
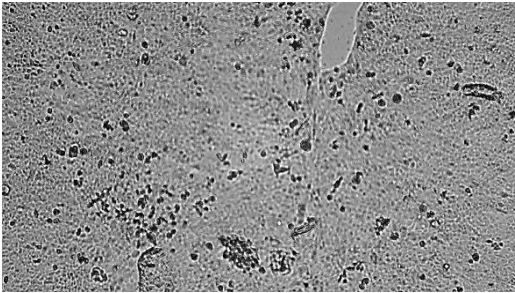
Scratch test č. 2, měření č. 4 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 2×10 sekund s pauzou 10 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 84 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

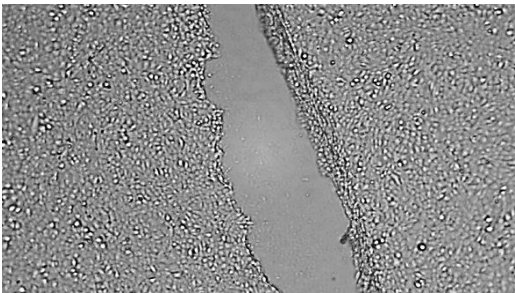
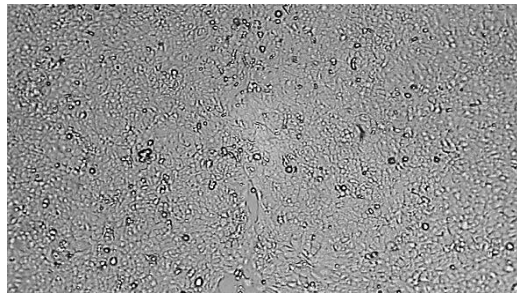
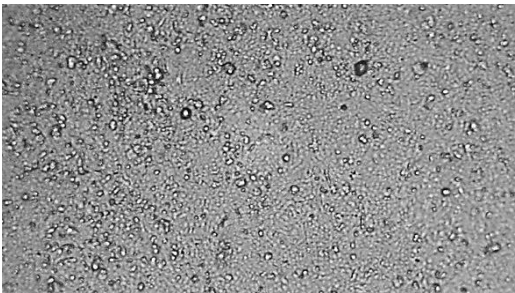
Scratch test č. 2, měření č. 5 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 2×30 sekund s pauzou 30 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 82 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

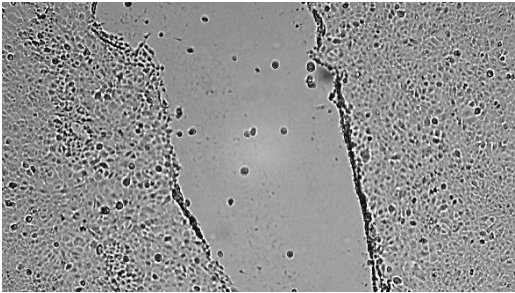
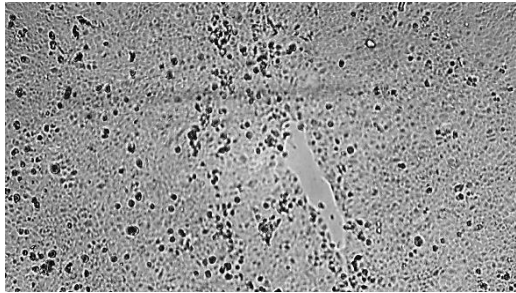
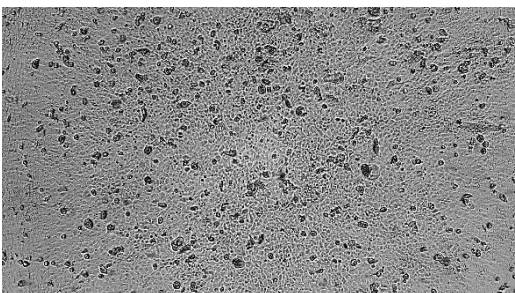
Scratch test č. 2, měření č. 6 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 10 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 57 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 94 % 	

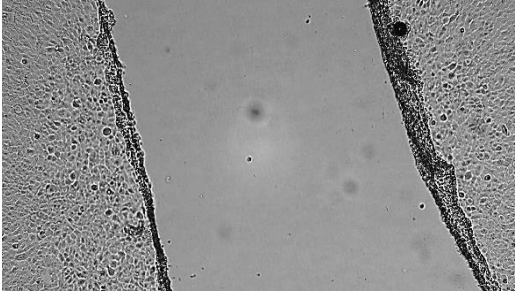
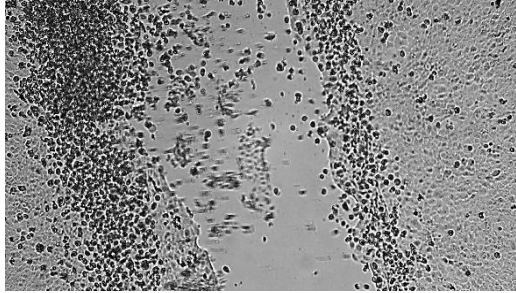
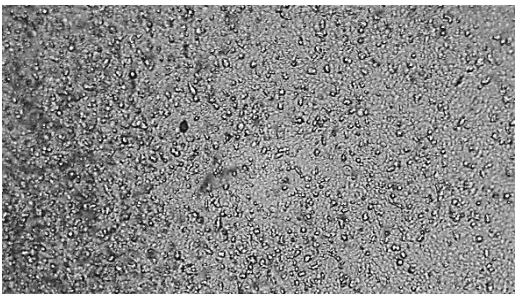
Scratch test č. 2, měření č. 7 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 20 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 85 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

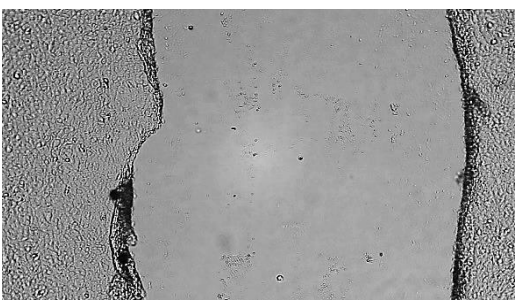
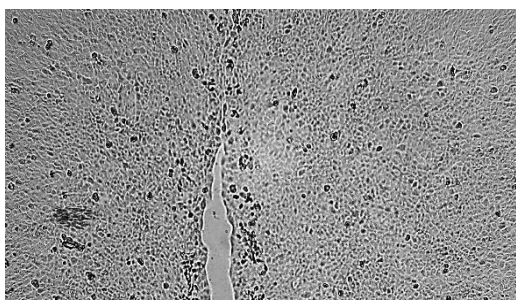
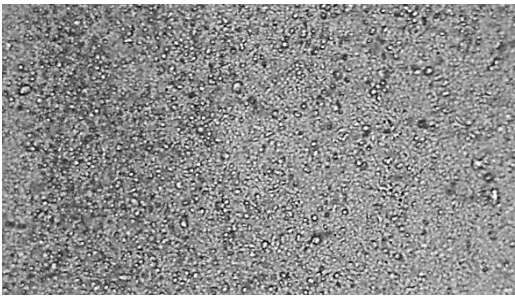
Scratch test č. 2, měření č. 8 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 30 s, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 91 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

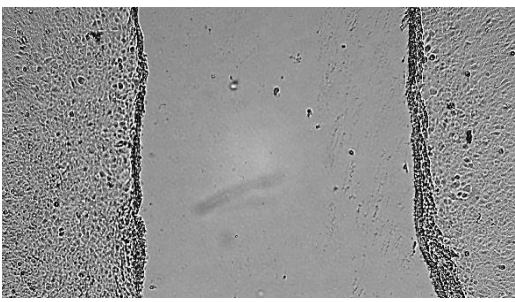
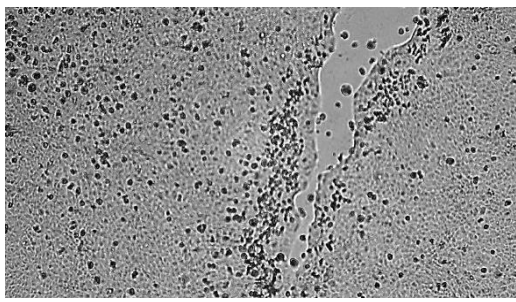
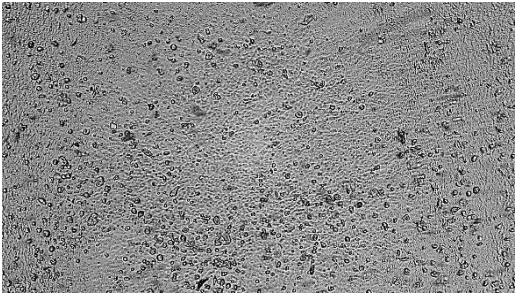
Scratch test č. 2, měření č. 9 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 2×10 sekund s pauzou 10 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 43 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

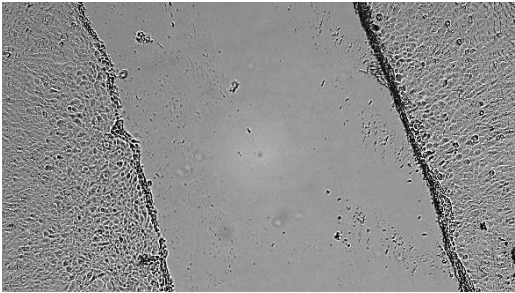
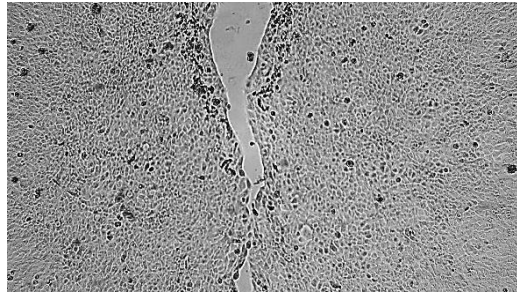
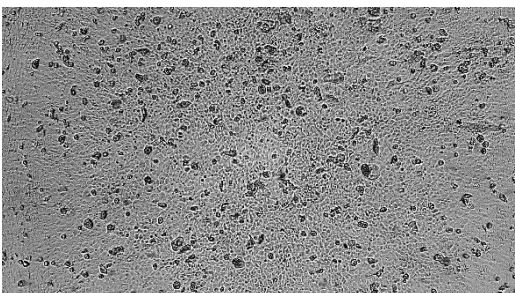
Scratch test č. 2, měření č. 10 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 2×30 sekund s pauzou 30 sekund, průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 95 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

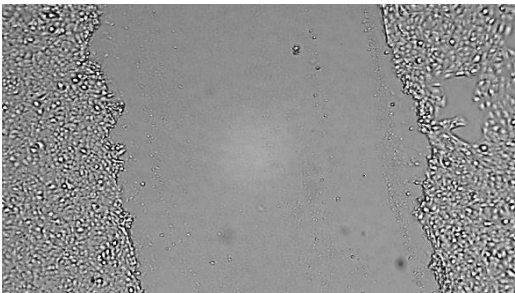
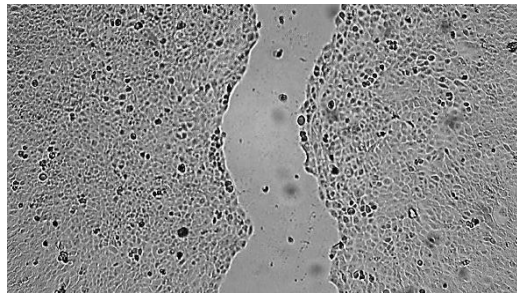
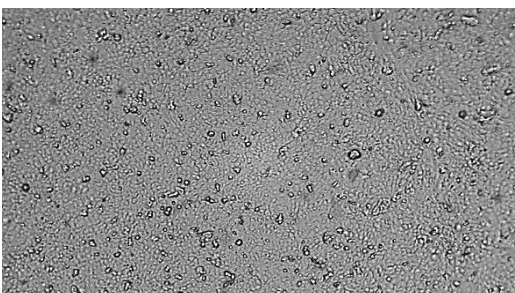
Scratch test č. 2, měření č. 11 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 10 s, průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 89 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

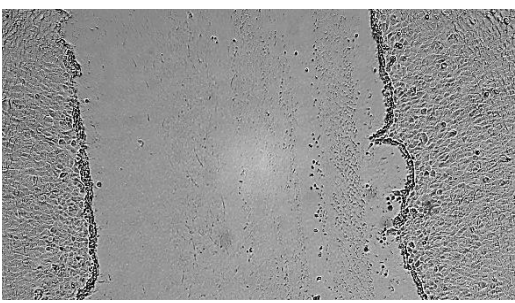
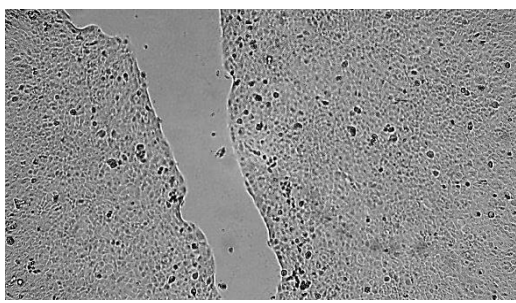
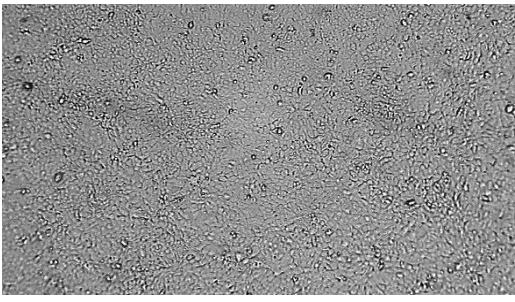
Scratch test č. 2, měření č. 12 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 20 s, průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 91 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

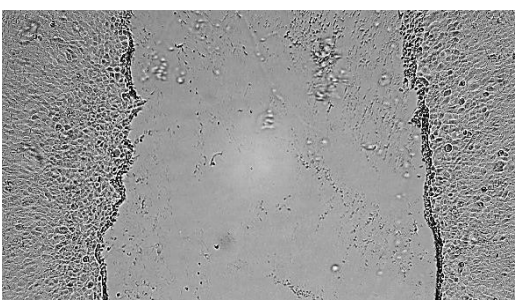
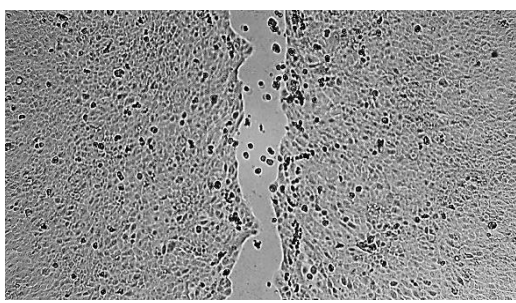
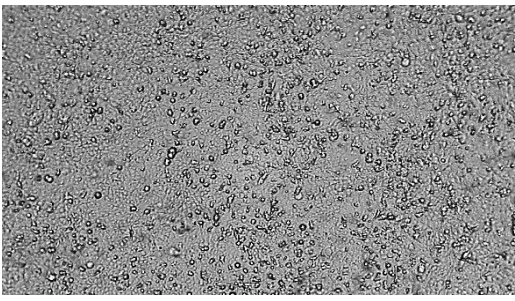
Scratch test č. 2, měření č. 13 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 30 s, průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 73 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

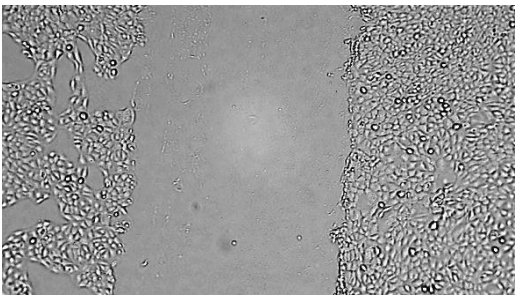
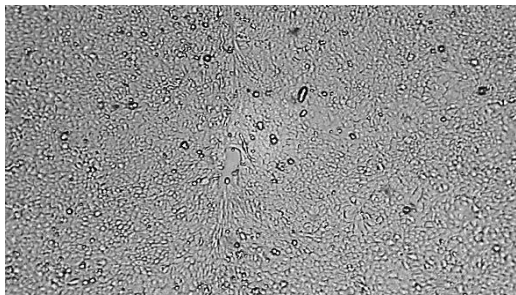
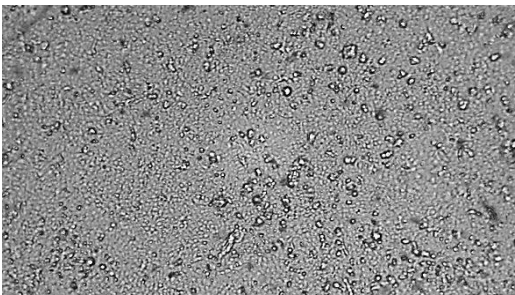
Scratch test č. 2, měření č. 14 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 2×10 sekund s pauzou 10 sekund, průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 80 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

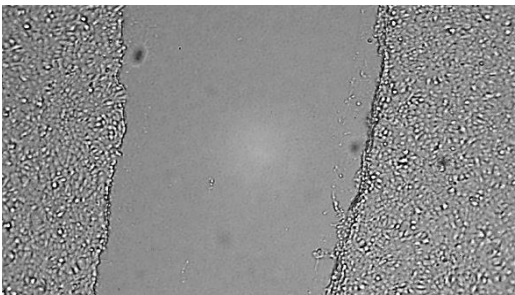
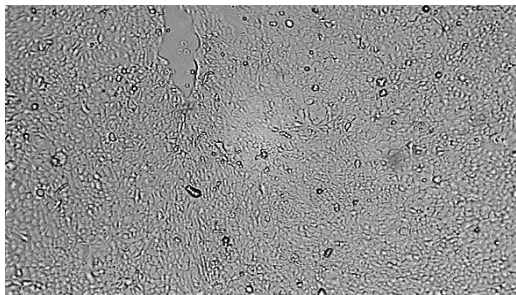
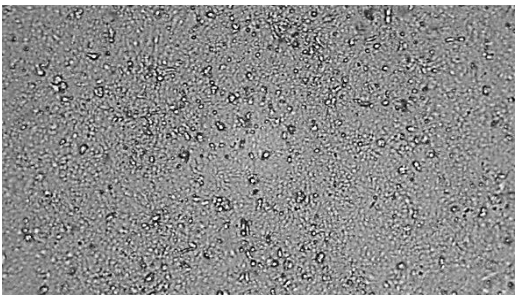
Scratch test č. 2, měření č. 15 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 2×30 sekund s pauzou 30 sekund průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 86 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

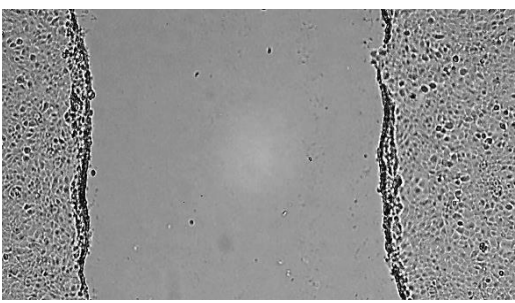
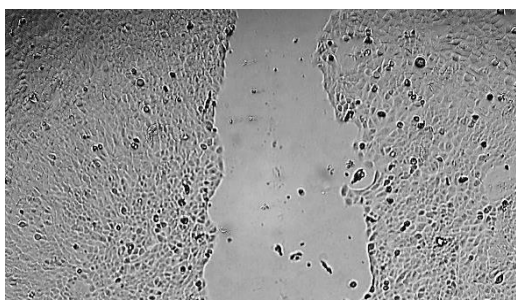
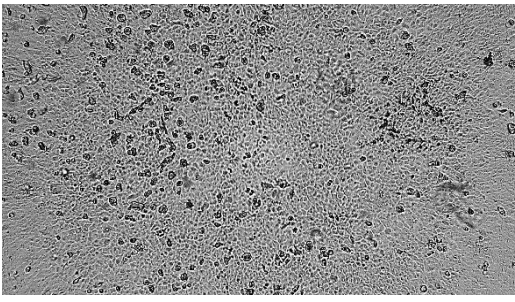
Scratch test č. 2, měření č. 16 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 10 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 3 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 97 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

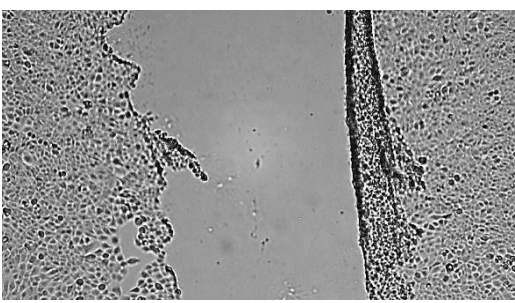
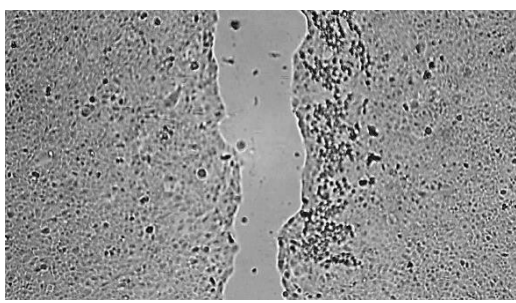
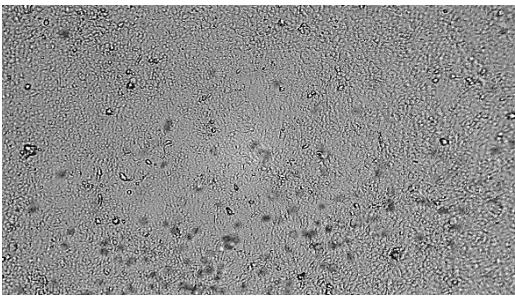
Scratch test č. 2, měření č. 17 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 20 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 3 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 95 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

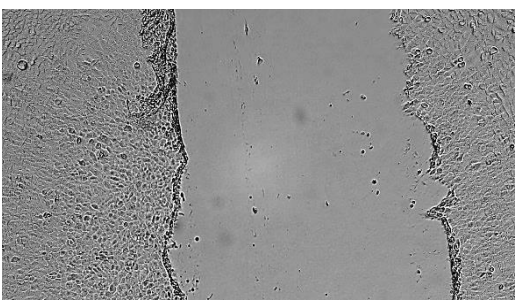
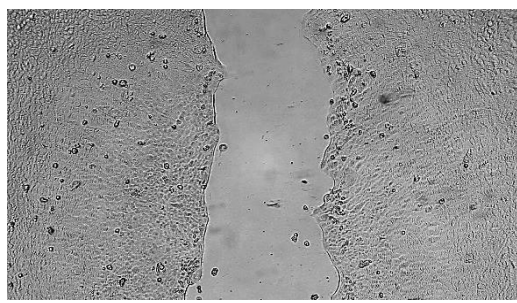
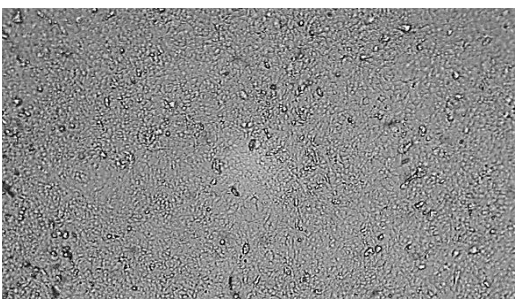
Scratch test č. 2, měření č. 18 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 30 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 3 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 68 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

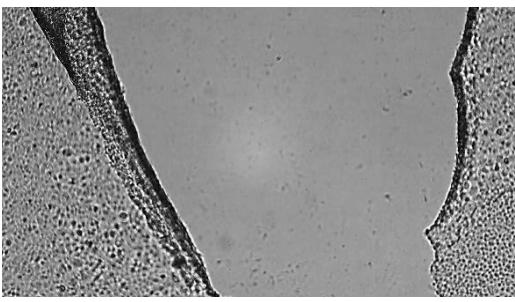
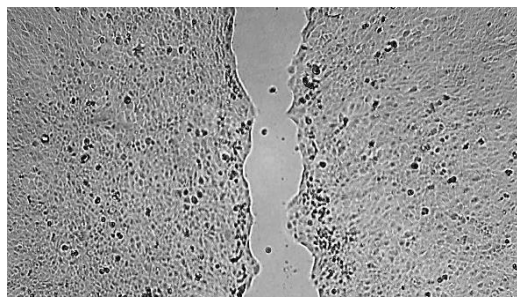
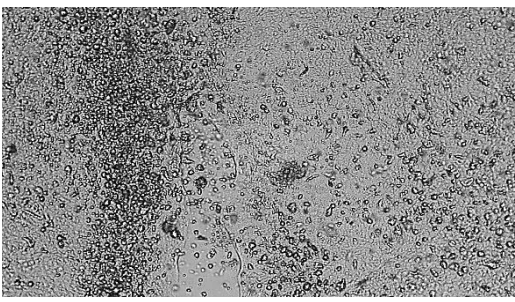
Scratch test č. 2, měření č. 19 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 10 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 3 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 59 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

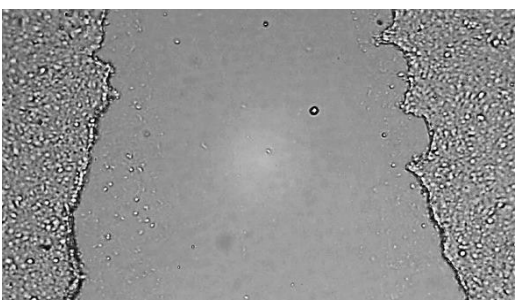
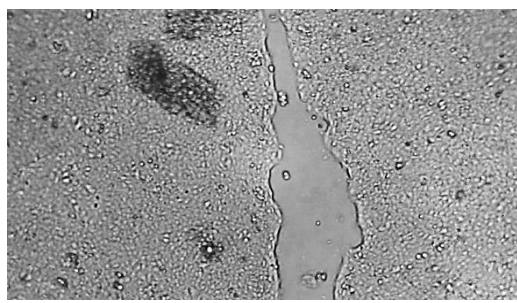
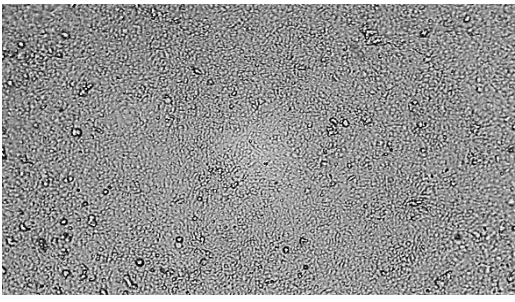
Scratch test č. 2, měření č. 20 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 20 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 3 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 53 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

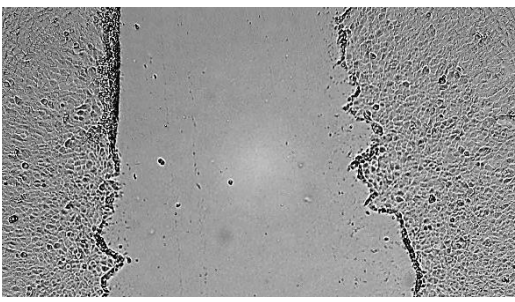
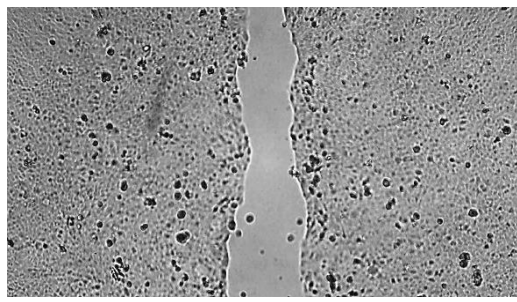
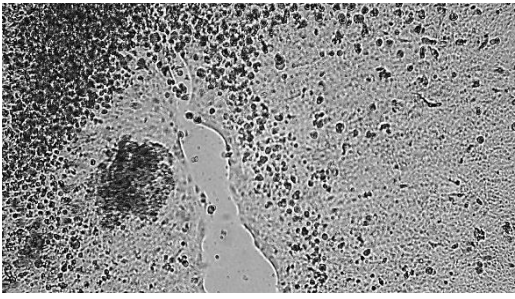
Scratch test č. 2, měření č. 21 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 30 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 3 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 80 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

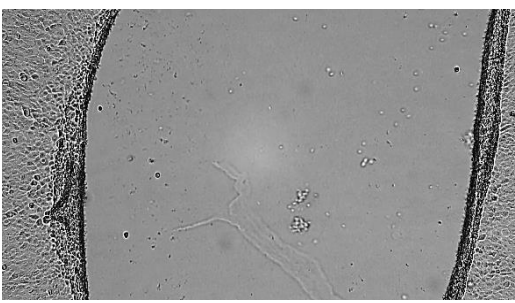
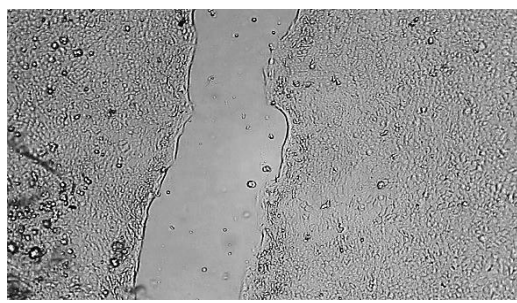
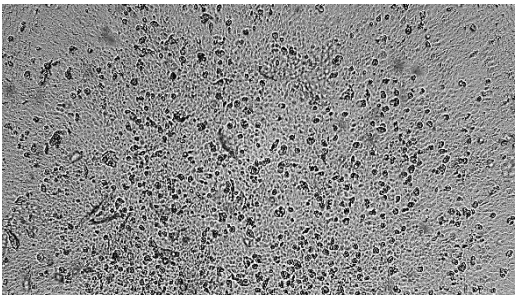
Scratch test č. 2, měření č. 22 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 10 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 81 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

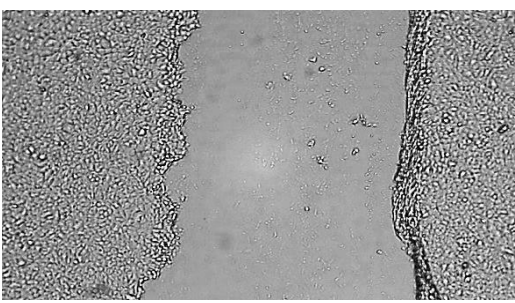
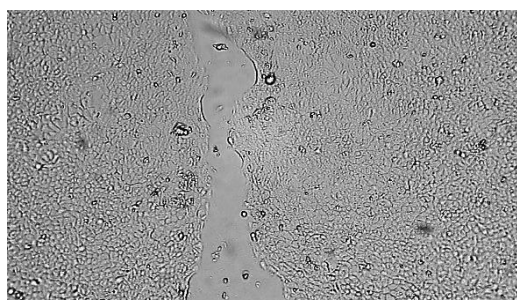
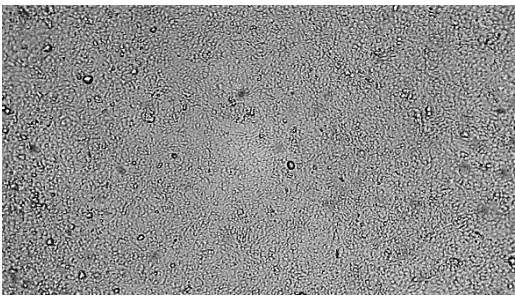
Scratch test č. 2, měření č. 23 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 20 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 84 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 88 % 	

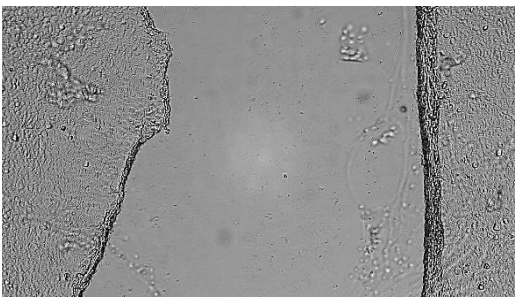
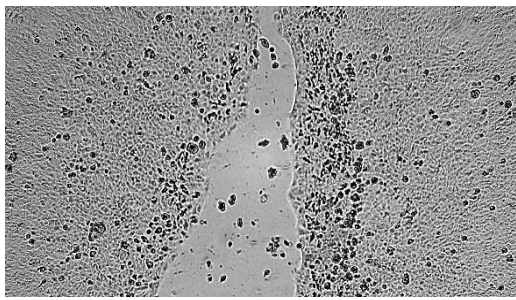
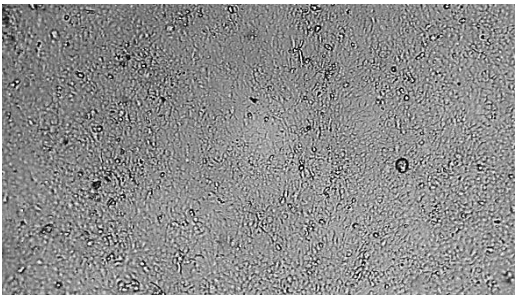
Scratch test č. 2, měření č. 24 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 8 W, doba oplazmování 30 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 6 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 70 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

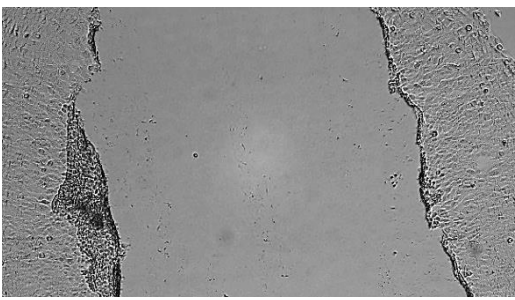
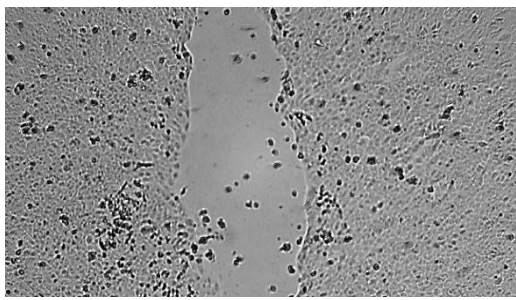
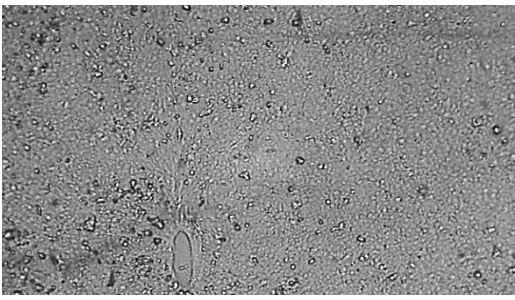
Scratch test č. 2, měření č. 25 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 10 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 83 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

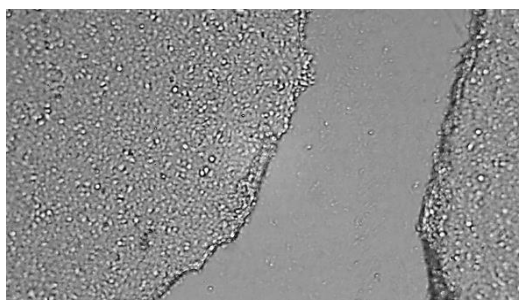
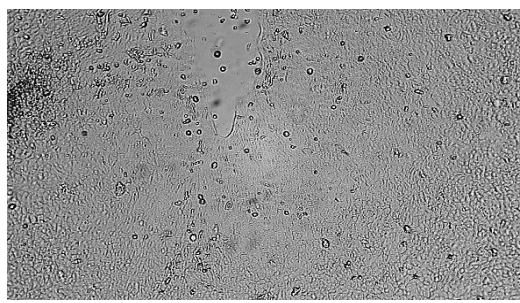
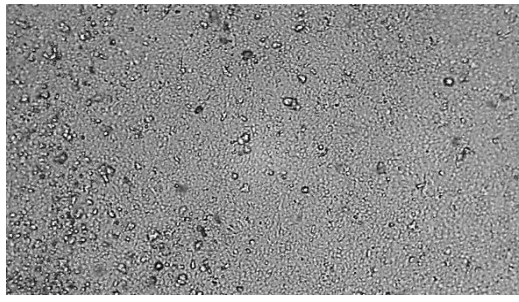
Scratch test č. 2, měření č. 26 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 20 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 69 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

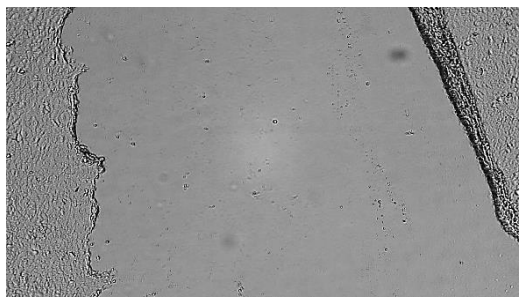
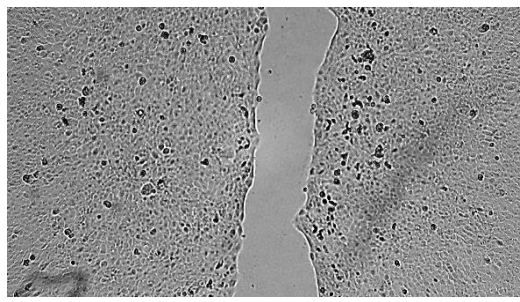
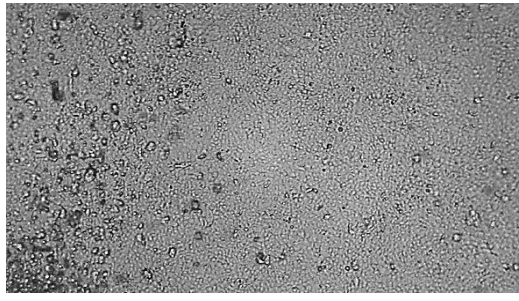
Scratch test č. 2, měření č. 27 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 30 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 4 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 66 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 97 % 	

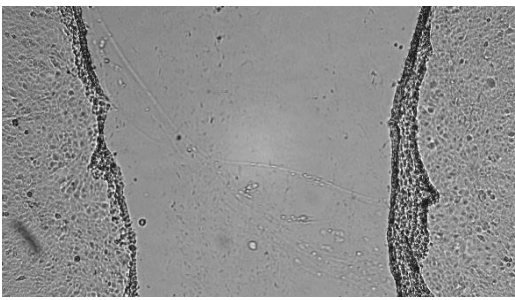
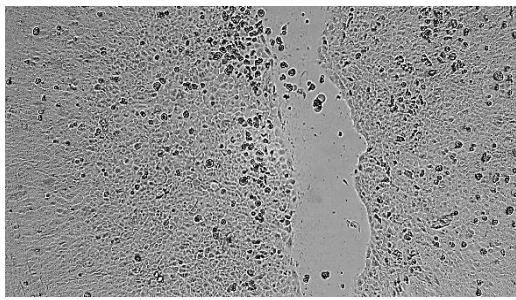
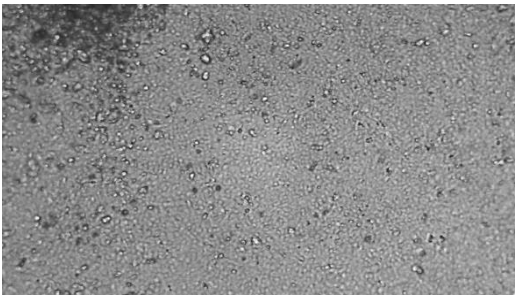
Scratch test č. 2, měření č. 28 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 10 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 90 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

Scratch test č. 2, měření č. 29 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 20 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 86 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	

Scratch test č. 2, měření č. 30 (0 h, 24 h, 48 h), zdroj č. 2, výkon 11 W, doba oplazmování 30 s (poté znovu po 24 h), průtok pracovního plynu 5 l/min, vzdálenost od kultivační destičky 3 mm, zvětšení 100x

0 h		24 h	
48 h		<p>0 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 0 % <p>24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 72 % <p>48 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • zacelení 100 % 	